

Inst. für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Analyse funktioneller Domänen  
von *SEC71* und *SEC72* im  
posttranslationalen Translokationsprozeß  
von *Saccharomyces cerevisiae***

zur Erlangung des akademischen Grades

**D o c t o r   r e r u m   n a t u r a l i u m**

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biochemiker Christian Unger

geboren am 3. April 1970 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. H. Meyer

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. J. P. Rabe

Gutachter:       1. Prof. Dr. S. Prehn  
                      2. Prof. Dr. W. Lockau  
                      3. Prof. Dr. R. Erdmann

eingereicht:       10. Januar 2000

Datum der Promotion: 29. März 2000

## Zusammenfassung

Die hier vorgelegte Arbeit analysiert funktionelle Domänen von Sec71p und Sec72p, zwei Komponenten des posttranslationalen Transports in das ER von *Saccharomyces cerevisiae*.

Die Kombination von Nullmutanten von *SEC71*, *SEC72* und *SBH1* führte zu den letalen Doppeldeletionsmutanten  $\Delta sec71/\Delta sbh1$  und  $\Delta sec72/\Delta sbh1$ . Beide Hefestämme zeigen starke Akkumulation von Präkursoren verschiedener Transportsubstrate *in vivo* und *in vitro*.

Ausgehend von den letalen Doppeldeletionsstämmen war es möglich, für die Funktion von Sec71p und Sec72p wesentliche Domänen zu bestimmen. Der cytosolische Bereich von Position 120-160 des Sec71p ist ausreichend für die Assoziation mit Sec62p und bildet außerdem einen Teil der Sec72p-Bindungsdomäne. Der sich anschließende C-terminale Bereich von 46 Aminosäuren ist ebenfalls ein Teil der Sec72p-Bindungsdomäne. Jede Teildomäne für sich kann Sec72p eingeschränkt anlagern, zusammen binden sie Sec72p Hochsalz-resistent und Alkali-beständig.

Sowohl eine C-terminale Verkürzung von Sec71p bis Position 160, als auch eine Sec71p-Variante ohne Membrananker und luminalen Teil können Sec71p funktionell ersetzen. Fusionsproteine von cytosolischen Bereichen des Sec71p und dem Membrananker des P450 aus *Candida maltosa* können es nicht. Der Membrananker von Sec71p ist somit nicht essentiell, kann aber auch nicht durch einen beliebigen Membrananker ersetzt werden.

Eine Sequenzanalyse von Sec72p identifizierte im C-Terminus von Sec72p eine potentielle TPR-Domäne. TPR-Domänen sind Bestandteile von Protein-Interaktionen, unter anderem auch im Protein-Targetingmechanismus von Mitochondrien und Peroxisomen. Es lag daher nahe, nach cytosolischen Interaktionspartnern von Sec72p zu suchen, die Teil eines posttranslationalen Targetingmechanismus sein könnten. Die Ergebnisse photochemischer Quervernetzungsexperimente werden genauso vorgestellt, wie die eines Screens zur Identifizierung synthetisch letaler Mutanten.

Durch Coimmunpräzipitationen wurde gezeigt, daß in Abwesenheit von Sec71p, Sec72p und Sbh1p die Assoziation von Sec61p mit Sec62p nicht beeinträchtigt wird.

Die hier präsentierten Daten in Kombination mit anderen Ergebnissen führen zu der Hypothese, daß Sec71p/Sec72p zusammen mit Sbh1p eine essentielle Funktion während eines frühen Schrittes der posttranslationalen Translokation ausüben. Wegen der möglichen gegenseitigen Komplementation wurden die drei Proteine bisher in genetischen Screens jedoch nie als essentiell für den posttranslationalen Transportprozeß gefunden.

## Abstract

This work is focused on the functional domains of Sec71p and Sec72p. These proteins are components of the posttranslational transport complex of the ER in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

Deletion mutants of *SEC71*, *SEC72* or *SBH1* are viable. However the deletion of two genes – either *SEC71* and *SBH1* or *SEC72* and *SBH1* resulted in a lethal phenotyp. Both double deletion strains accumulate different transport substrats *in vivo* and *in vitro*.

Exploiting the lethal strains it was possible to investigate the function of special domains of Sec71p and Sec72p in detail. The cytosolic part of Sec71p from amino acid (aa) 120 to 160 is sufficient for the association of Sec71p with Sec62p. It is also part of the Sec72p binding domain since it binds Sec72p weakly. A tight association (resistant to high salt and alkaline pH) is achieved by the additional interaction of Sec72p with the C-terminal aa 160-206 of Sec71p.

The C-terminal truncation of Sec71p up to aa 160 is able to rescue a  $\Delta sec71/\Delta sbh1$  deletion strain. Even a Sec71p-variation without the luminal part and membrane anchor can functionally replace the wt-protein whereas fusion proteins of different cytosolic parts of Sec71p with a transmembrane domain of *P450* of *Candida maltosa* are not able to do it. The transmembrane domain of Sec71p seems not to be essential for proteins function. A membrane anchor of a different protein abolishes the correct interaction of Sec71p with its partners of the translocon.

A sequence analysis of *SEC72* identified a C-terminal domain with similarity to a TPR-domain. TPR-domains mediate protein interactions and they participate for instance in the targeting of proteins to the mitochondria or peroxisomes. Therefore we searched for cytosolic interaction partners of Sec72p. The results of photoreactive crosslinking studies and of a screen for synthetic lethality are presented in this work.

By co-immunoprecipitation we showed that the association between Sec61p and Sec62p is not altered in the absence of Sec71p, Sec72p and Sbh1p.

The results presented herein combined with other data gave rise to the hypothesis that Sec71p/Sec72p together with Sbh1p are essential for an early step of the posttranslational translocation. Because of their overlapping functions neither one of them was found to be essential for the posttranslational transport in former genetic screens.



Schlagwörter:

Posttranslatiöner Transport, *Saccharomyces cerevisiae*, SEC71, SEC72

Keywords:

Posttranslational transport, *Saccharomyces cerevisiae*, SEC71, SEC72

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>12</b>
1.1	DAS TARGETING ZUM ENDOPLASMATISCHEN RETIKULUM.....	12
1.2	DER TRANSPORT IN DAS ENDOPLASMATISCHE RETIKULUM .....	14
1.3	DIE HEFE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> BESITZT DREI UNABHÄNGIGE PROTEINKOMPLEXE ZUR TRANSLOKATION IN DAS ER.....	16
1.4	DIE TRANSLOCASE IN <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	21
1.5	ZIELSETZUNG .....	24
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>25</b>
2.1	MATERIAL.....	25
2.1.1	<i>Verwendete Hefestämme</i> .....	25
2.1.2	<i>Verwendete Plasmide</i> .....	26
2.1.3	<i>Verwendete Oligonukleotide</i> .....	28
2.1.4	<i>Verwendete Antikörper</i> .....	30
2.1.5	<i>Puffer und Lösungen</i> .....	30
2.2	METHODEN .....	32
2.2.1	<i>Allgemeine molekularbiologische Methoden</i> .....	32
2.2.2	<i>Biochemische Methoden</i> .....	32
2.2.2.1	In vitro Transkription und in vitro Translation.....	32
2.2.2.2	Protein-Quervernetzung unter Verwendung von photoreaktivem TDBA-Lys.....	33
2.2.2.3	Immunpräzipitation .....	33
2.2.2.4	Puls-Markierung von Transportproteinen .....	34
2.2.2.5	Bestimmung der Lokalisierung von Membranproteinen .....	34
2.2.3	<i>Methoden zum Arbeiten mit <i>S. cerevisiae</i> (Bäckerhefe)</i> .....	35
2.2.3.1	Transformation von Hefen mit Plasmid-DNA .....	35
2.2.3.1.1	Lithiumacetat-Methode .....	35
2.2.3.1.2	Hefetransformation mittels Elektroporation .....	35
2.2.3.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen .....	36
2.2.3.3	Kreuzung, Sporulation und Tetradenanalyse.....	36
2.2.3.4	Durchführung eines genetischen Screens zur Identifizierung synthetisch letaler Mutanten.....	37
2.2.3.5	Präparation von Hefemembranen .....	38
2.2.3.5.1	Präparation von Hefemembranen aus kleinen Kulturen.....	38
2.2.3.5.2	Präparation von Hefemembranen aus großen Kulturen.....	38

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>41</b>
3.1	ANALYSE DER FUNKTION VON SEC71 .....	41
3.1.1	<i>Coletalität von SEC71 in Kombination mit <math>\Delta sbh1</math>.....</i>	<i>41</i>
3.1.2	<i>Die N-terminalen 160 Aminosäuren des Sec71p sind in vivo in Abwesenheit von Sbh1p essentiell.....</i>	<i>44</i>
3.1.3	<i>Der C-Terminus von Sec71p ist notwendig für die Bindung von Sec72p, sowohl in vivo als auch in vitro.....</i>	<i>46</i>
3.1.4	<i>Ein 160-mer von Sec71p ist erforderlich für die Assoziation mit dem SEC-Komplex.....</i>	<i>48</i>
3.1.5	<i>Die 46 C-terminalen Aminosäuren von Sec71p sind ausreichend, um Sec72p zu binden.....</i>	<i>50</i>
3.1.6	<i>Der P450Cm1-Membrananker aus Candida maltosa ist nicht in der Lage den Sec71-Membrananker zu ersetzen.....</i>	<i>52</i>
3.2	UNTERSUCHUNGEN ZUR ROLLE VON SEC72.....	54
3.2.1	<i>Coletalität von SEC72 in Kombination mit <math>\Delta sbh1</math>.....</i>	<i>54</i>
3.2.2	<i>Eine C-terminale TPR-Domäne des Sec72p ist essentiell für seine Funktion. ....</i>	<i>55</i>
3.2.3	<i>Die Deletion der TPR-Domäne ändert nicht die Lokalisierung von Sec72<math>\Delta</math>TPRp.....</i>	<i>57</i>
3.3	QUERVERNETZUNGSTUDIEN ZUR IDENTIFIZIERUNG VON INTERAKTIONS-PARTNERN VON SEC72P. ....	58
3.4	SCREEN ZUR IDENTIFIZIERUNG SYNTHETISCH LETALER MUTANTEN IN KOMBINATION MIT $\Delta$ SEC72. ....	61
3.5	URSACHEN FÜR DIE SYNTHETISCHE LETALITÄT VON $\Delta$ SEC71/ $\Delta$ SBH1 UND $\Delta$ SEC72/ $\Delta$ SBH1 .....	62
3.5.1	<i>Die Stämme <math>\Delta sec71/\Delta sbh1/\Delta sbh2</math> und <math>\Delta sec72/\Delta sbh1/\Delta sbh2</math> zeigen deutliche Transportdefekte. ....</i>	<i>63</i>
3.5.2	<i>Untersuchungen zur Stabilität des posttranslationalen Komplexes.....</i>	<i>68</i>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>71</b>
4.1	DIE VERSCHIEDENEN DOMÄNEN DES SEC71P UND IHRE FUNKTIONEN .....	71
4.2	SEC72P BESITZT EINE POTENTIELLE INTERAKTIONSSTELLE FÜR CYTOSOLISCHE PROTEINE .....	73
4.3	SYNTHETISCHE LETALITÄT ALS INDIKATOR FÜR INTERAKTIONEN UND ERGÄNZENDE FUNKTIONEN .....	76
4.4	SIND SEC71P/SEC72P UND DIE BETA-UNTEREINHEIT DES TRANSLOKONS ANALOGE PROTEINE ?.....	79
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>81</b>

## Abkürzungsverzeichnis

5'FOA	<b>5'</b> -Fluoroovatic <b>A</b> cid
$\lambda$	Wellenlänge des Lichtes in nm
aa	Aminosäuren (engl. <b>a</b> mino <b>a</b> cids)
Å	Ångstrom ( $10^{-10}$ m)
ATTC	Amerikanische Kultur- und Gewebebank (engl. American type culture collection), <a href="http://www.attc.org">http://www.attc.org</a>
CPY	<b>C</b> arboxypeptidase <b>Y</b>
DMSO	<b>D</b> imethylsulfoxid
DTT	<b>D</b> ithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure (engl. ethylendi <b>a</b> min- <b>t</b> etra- <b>a</b> cetic-acid)
Endo H	<b>E</b> ndoglykosidase <b>H</b>
eq	Äquivalent (engl. <b>e</b> quivalent), Konzentrationsangabe bei Membranen. 0,02 OD <sub>280</sub> = 1 eq/μl.
ER	<b>E</b> ndoplasmatisches <b>R</b> etikulum
HEPES	N-[2- <b>H</b> ydroxyethyl]piperazin-N'-2-ethan-sulfonsäure
KOAc	Kaliumacetat
mCPY	reife ( <b>m</b> ature) Form der <b>C</b> arboxypeptidase <b>Y</b>
NAC	<b>N</b> ascent polypeptide <b>A</b> ssociated <b>C</b> omplex
nm	<b>N</b> anometer ( $10^{-9}$ m)
OD <sub>600</sub>	<b>O</b> ptische <b>D</b> ichte bei der Wellenlänge $\lambda = 600$ nm
PAGE	<b>P</b> olyacrylamid <b>G</b> elelektrophorese
PGK	<b>P</b> hosphoglycerat <b>k</b> inase
PI	<b>P</b> rotease- <b>i</b> nhibitor Mix
PMSF	<b>P</b> henyl <b>m</b> ethylsulfonsäure <b>f</b> luorid, Inhibitor von Serinproteasen
ppCPY	<b>P</b> rä <b>p</b> ro-Form der <b>C</b> arboxypeptidase <b>Y</b>
RT	<b>R</b> aum <b>t</b> emperatur
s	<b>S</b> ekunde
SBH1	<b>S</b> ec sixty-one <b>b</b> eta <b>h</b> omolog <b>1</b>
SBH2	<b>S</b> ec sixty-one <b>b</b> eta <b>h</b> omolog <b>2</b>
<i>S.c.</i>	<i>Saccharomyces</i> <b>c</b> erevisiae (Bäckerhefe)
SD	Glucose-haltiges Minimalmedium für Hefen
SDS	Natrium-dodecylsulfat (engl. sodium- <b>d</b> odecylsulfat)

---

SGal	Galactose-haltiges Minimalmedium für Hefen
SIM2	SIM = ‘start independent of <b>m</b> itosis’ (engl.); SIM2 = SEC72
SR	<b>S</b> RP- <b>R</b> ezeptor
SRP	Signalerkennungspartikel (engl. <b>S</b> ignal <b>r</b> ecognition <b>p</b> artikel)
SRP54	54 kD Untereinheit des Signalerkennungspartikels (SRP)
SSH1	<b>S</b> ec <b>s</b> ixty-one <b>h</b> omolog <b>1</b>
SSS1	<b>S</b> ec <b>s</b> ixty-one <b>s</b> uppressor <b>1</b>
SUC 2	Gen für Invertase
TCA	Trichloressigsäure (engl. <b>t</b> richlor- <b>a</b> cetic acid)
TDBA-Lys	<b>T</b> rifluoromethyl- <b>d</b> iazirino- <b>b</b> enzoic- <b>a</b> cid- <b>l</b> ysin
TPR-Domäne	<b>T</b> etratrico <b>p</b> eptido <b>r</b> epet- <b>d</b> omäne
TRAM	<b>T</b> ranslocating chain <b>a</b> ssociated <b>m</b> embrane protein
Tris	<b>T</b> ris-(hydroxymethyl)-aminomethan
W	<b>W</b> att
wt	<b>W</b> ildtyp
YPD	Glucose-haltiges Vollmedium für Hefen

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Die Hefe <i>S. cerevisiae</i> hat drei verschiedene Translokationskomplexe für den ER-Import.	Seite 16
Abb. 2	Vergleich der wichtigsten Komponenten für den Proteintransport durch die eukaryontische ER-Membran (Säuger; <i>S.cerevisiae</i> ) bzw. prokaryontische Plasmamembran ( <i>E.coli</i> ; Archaea).	Seite 23
Abb. 3	Genetische Interaktion von <i>SEC71</i> und <i>SBH1</i> .	Seite 42
Abb. 4	Versuch zur Komplementation des Hefestamms $\Delta sec71/\Delta sbh1$ .	Seite 43
Abb. 5	Coimmunpräzipitation zur Analyse der Komplexumgebung von Sbh2p in Abwesenheit von Ssh1p.	Seite 44
Abb. 6	Schematische Darstellung der C-terminalen Verkürzungen von <i>SEC71</i> .	Seite 44
Abb. 7	Versuch zur Komplementation des Hefestamms $\Delta sec71/\Delta sbh1$ mit C-terminalen Verkürzungen von <i>SEC71</i> .	Seite 45
Abb. 8	Anlagerungsverhalten von Sec72p an C-terminale Verkürzungen von Sec71p.	Seite 46
Abb. 9	Untersuchung zur <i>in vitro</i> Anlagerung von Sec72p an verschiedene Sec71p-Varianten.	Seite 47
Abb. 10	Western Blot und Coimmunpräzipitationen der verkürzten Sec71p-myc Fusionsproteine.	Seite 49
Abb. 11	Schematische Darstellung der Fusionsproteine von P450 Cm1-Membrananker aus <i>Candida maltosa</i> (P450 Cm11-44) und verschiedenen cytosolischen Fragmenten von <i>S.c.</i> Sec71p.	Seite 50
Abb. 12	Untersuchung zur Expression von P450-Sec71p-Fusionsproteinen und dem Anlagerungsverhalten von Sec72p an diese Fusionsproteine.	Seite 51
Abb. 13	Coimmunpräzipitation der P450-Sec71p-Fusionsproteine mit Antikörpern gegen Sec62p.	Seite 53
Abb. 14	Genetische Interaktion von <i>SEC72</i> und <i>SBH1</i> .	Seite 55
Abb. 15	Aminosäuresequenz von <i>S.c.</i> <i>SEC72</i> .	Seite 56
Abb. 16	Genetische Untersuchung zur Rolle der TPR-Domäne des Sec72p in Abwesenheit von <i>SBH1</i> .	Seite 57
Abb. 17	Untersuchung zur Lokalisierung von Sec72-TPRp.	Seite 58

---

Abb. 18	Photoreaktive Quervernetzung von Sec72p zu seiner Membranumgebung.	Seite 59
Abb. 19	Immunpräzipitation des Sec72p-Quervernetzungsproduktes mit Antikörpern gegen verschiedene Proteine des SEC-Komplexes.	Seite 60
Abb. 20	<i>In vivo</i> System zur Untersuchung der letalen Hefestämme durch Repremierung des Methionin-Promotors.	Seite 64
Abb. 21	Untersuchung zur Akkumulation von ppCPY im steady state in verschiedenen letalen Stammhintergründen.	Seite 65
Abb. 22	Pulse-Markierung zur Detektion von CPY Präkursor-Akkumulation.	Seite 66
Abb. 23	Präkursor-Akkumulation von pre-Invertase im steady state.	Seite 68
Abb. 24	Der SEC-Restkomplex ist in Abwesenheit von Sec71p, Sec72p und Sbh1p stabil.	Seite 70

# 1 Einleitung

Der gezielte Transport von Proteinen durch Membranen ist ein wichtiger Prozeß für den Erhalt der Zelle. Man kennt heute verschiedene Translokationssysteme in den unterschiedlichen Organismen, sowohl in Pro- als auch Eukaryonten. Die meisten von ihnen funktionieren nach einem allgemeinen Schema: Das zu translozierende Protein ist durch ein Signal in Form einer Aminosäuresequenz gekennzeichnet. Durch eine von mehreren Möglichkeiten (Hitzeschockproteine oder Elongationsarrest) wird es daran gehindert sich endgültig zu falten und verbleibt somit in einem transportkompetenten Zustand. Durch einen noch zu erforschenden Prozeß gelangt das translokationskompetente Protein zu einem porenbildenden Membranproteinkomplex, wo nach einem Kontrollschritt der Durchtritt durch die Membran erfolgt. Nach der Translokation erfolgt die Faltung und eventuelle Reifung zum funktionellen Protein.

Dieser allgemeine Ablauf wurde in der Evolution auf unterschiedliche Weise realisiert, und man findet entsprechende Transportsysteme in Mitochondrien, Chloroplasten und Peroxisomen.

Der Sec61-Komplex der Hefe *S.cerevisiae* ist ein zentrales Translokationssystem des Endoplasmatischen Retikulums, verwandte Translokationskomplexe wurden in allen bisher untersuchten Organismen gefunden. Eine erweiterte Form des Sec61-Komplexes, der SEC-Komplex, steht im Mittelpunkt dieser Arbeit. Er dient dem posttranslationalen Import von Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum der Hefe.

## 1.1 Das Targeting zum Endoplasmatischen Retikulum

Für Proteine des sekretorischen Weges erfolgt der Membrandurchtritt bzw. die Membraninsertion im Endoplasmatischen Retikulum (ER). Der weitere Transport zu den einzelnen Kompartimenten (Golgi-Apparat, Lysosomen, Endosomen, sekretorische Vesikel und Zellmembran) erfolgt durch vesikulären Transport, ein weiterer Membrandurchtritt ist nicht erforderlich (Palade, 1975).

Sekretorische Proteine zeichnen sich durch eine meist N-terminal gelegene Signalsequenz aus. Signalsequenzen sind zwischen 15 und 40 Aminosäuren lang und besitzen einen dreiteiligen physikochemischen Aufbau. Ein hydrophober Kernbereich wird von einer positiv geladenen N-terminalen Region und einer polaren C-terminalen Region eingeschlossen (Hauptle et al., 1989; von Heijne, 1990). Die C-terminale Region enthält die Schnittstelle für



die Signalpeptidase, die die Signalsequenz nach erfolgtem Membrandurchtritt proteolytisch abspaltet (von Heijne, 1985; Evans et al., 1986). Außerdem gibt es Signalankersequenzen, die zur Verankerung von Membranproteinen in der ER-Membran führen (Wickner und Lodish, 1985; Lipp et al., 1989; Andersson und von Heijne, 1994; Spiess, 1995).

Prinzipiell kann man zwei Translokationsmechanismen unterscheiden. Einmal wird das zu translozierende Protein schon während seiner Synthese, zu einem Zeitpunkt an dem es noch keine Sekundär- oder Tertiärstruktur entwickelt hat, durch die Membran transportiert. Diesen Prozeß bezeichnet man als cotranslationalen Transport. Demgegenüber steht der posttranslationale Transport, bei dem erst das vollständig synthetisierte Protein transloziert wird. Beide Prozesse unterscheiden sich vor allem in dem Zeitpunkt, an dem die Signalsequenz erkannt werden muß. Der cotranslationale Transport setzt eine möglichst frühe Erkennung der Signalsequenz voraus, während dies bei einem posttranslationalen Transport nicht zwingend notwendig ist.

Die Erkennung von Signalsequenzen des cotranslationalen Weges erfolgt am translatierenden Ribosom. Die Signalsequenz der naszierenden Polypeptidkette wird vom 'Signal Recognition Particle' (SRP) erkannt und gebunden. Entscheidend für die Erkennung ist der hydrophobe Charakter der Signalsequenz (Ng et al., 1996).

Das SRP der Säuger ist ein Ribonucleoprotein-Komplex aus 7 Proteinen (9, 14, 19, 54, 68 und 72 kD) und einer 7S RNA (Walter und Blobel, 1980, 1981; Zu Homologien siehe Abb. 2). Wenn SRP die Signalsequenz eines naszierenden Polypeptids erkennt, bindet es sowohl an das Ribosom als auch an die naszierende Polypeptidkette, bewirkt einen Elongationsarrest und dirigiert den so entstandenen Komplex an die raue ER-Membran. An der ER-Membran befindet sich der SRP-Rezeptor (Meyer et al., 1982; Gilmore et al., 1982) an den der Komplex aus Ribosom, naszierender Polypeptidkette und SRP bindet. Der SRP-Rezeptor (SR) besteht aus zwei integralen Membranproteinen,  $\alpha$ -SR (69 kD) und  $\beta$ -SR (30 kD) (Meyer et al., 1982; Gilmore et al., 1982; Tajima et al., 1986). Durch Hydrolyse von GTP wird das SRP aus dem Komplex entlassen und der Komplex aus Ribosom und naszierender Kette assoziiert mit dem Translokon (Connolly und Gilmore, 1989; Rapiejko und Gilmore, 1994).

Ein weiterer Ribosomen-assoziiierter Komplex, genannt NAC für 'Nascent Polypeptide Associated Complex', wurde von Wiedmann et al. (1994) beschrieben. NAC interagiert wahrscheinlich noch vor SRP mit der naszierenden Polypeptidkette. Quervernetzungen von der naszierenden Polypeptidkette zum NAC findet man bereits ab einer Kettenlänge von 17 Aminosäuren (Wang et al., 1995). In Abwesenheit von NAC bindet SRP *in vitro* auch an

naszierende Ketten die keine Signalsequenz haben. Man nimmt daher an, daß NAC einen regulatorischen Einfluß auf die Bindung von SRP an die Signalsequenz hat (Wiedmann et al., 1994). Ob NAC einen Einfluß auf die Ribosomenbindung an das Translokons hat, wird kontrovers diskutiert (siehe hierzu Neuhof et al., 1998; Raden und Gilmore, 1998 und Möller et al., 1998).

Das Targeting von posttranslationalen Substraten an die ER-Membran ist SRP-unabhängig. Dennoch muß gewährleistet werden, daß die Translokationssubstrate in einem transportkompetenten Zustand gehalten werden. Für die cytosolische Hsp70-Familie *SSA1* bis *SSA4* wurde eine Beteiligung der Gen-Produkte an der Translokation in das ER und in Mitochondrien nachgewiesen (Deshaies et al., 1988; Chirico et al., 1998). Ein Mehrfach-Deletionsstamm  $\Delta SSA1/\Delta SSA2/\Delta SSA4$  zeigt starke Präkursorakkumulation von präpro- $\alpha$ -Faktor (Deshaies et al., 1988). Eine Interaktion wurde auch für YDJ1, einem DnaJ-Homologen, gefunden. Temperatursensitive Mutanten von Ydj1p zeigen bei der nichtpermissiven Temperatur Akkumulation von präpro- $\alpha$ -Faktor und sind in Kombination mit  $\Delta SSA1^{ts}/\Delta SSA2/\Delta SSA4$  letal (Caplan und Douglas, 1991; Atenico und Yaffee, 1992; Becker et al., 1996).

## **1.2 Der Transport in das Endoplasmatische Retikulum**

Die Beteiligung des Sec61-Komplexes an der Translokation wurde durch genetische Screens in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Deshaies und Schekman, 1987), und durch proteinchemische Aufreinigung und Charakterisierung im Säuger (Görllich et al., 1992; Görllich und Rapoport, 1993) identifiziert. In Prokaryonten (*E.coli*) kennt man den homologen SecYEG-Komplex (Brundage et al., 1992).

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind die rekonstituierten Sec61-Komplexe aus Hund bzw. Bäckerhefe als porenbildende Proteinkomplexe zu erkennen (Hanein et al., 1996; Beckmann, et al., 1997). Beckmann et al. (1997) konnten zeigen, daß in elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Sec61-Komplexes mit Ribosom, die Membranpore die Verlängerung des Ribosomentunnels darstellt. Dabei lagern sich 3-4 heterotrimere Sec61-Komplexe zu einer quasi-pentagonalen Struktur mit einem Aussendurchmesser von ca. 85 Å zusammen, in deren Mitte ein Bereich geringerer Elektronendichte liegt. Dieser Bereich von ca. 20 Å Durchmesser wird als Pore interpretiert (Hanein et al., 1996). Hamman et al. (1997, 1998) haben versucht, die Größe der Pore mit Hilfe eines fluoreszierenden Lysin-Derivats, das in die naszierende Polypeptidkette eingebaut wird, zu bestimmen. Dabei entdeckten sie,

daß der Kanal erst ab einer Kettenlänge des Polypeptids von 70 Aminosäuren geöffnet wird, und daß fluoreszenzunterdrückende Agenzien bis zu einer Größe von 40-60 Å vom Lumen der Proteoliposomen bis in den Tunnel des Ribosoms vordringen können. Dabei ist die Bindung des Ribosoms an die Membran so dicht, daß fluoreszenzunterdrückende Agenzien nicht von der cytosolischen Seite an die naszierende Kette gelangen. Neben diesen großen – durch Ribosomenassoziation hervorgerufene Poren – fanden sie, daß nicht mit Ribosomen assoziierte Sec61-Komplexe einen wesentlich kleineren Porendurchmesser von 9-15 Å aufweisen (Hamman et al., 1998), was wiederum mit den oben genannten Daten von Hanein et al. (1996) übereinstimmt.

Eine Funktion der ER-Membran ist die Aufrechterhaltung einer Permeabilitätsbarriere. Die oben erwähnten Daten lassen diesen Aspekt vermissen, da auch in Abwesenheit von Ribosomen kleine Poren beschrieben werden. Ob man *in vivo* vergleichbare Poren finden würde, oder ob diese Poren vielleicht durch Proteine verschlossen werden, ist bisher ungeklärt. Klar ist nur die unausweichliche Notwendigkeit einer Permeabilitätsbarriere.

Die unterschiedlichen Porengrößen für Komplexe mit bzw. ohne naszierende Polypeptidkette sind daher vor allem deutliche Anzeichen für den dynamischen Charakter des Translokons, das durch Interaktion mit anderen Membrankomponenten und vor allem dem Ribosom zwischen Permeabilitätsbarriere und Membranpore wechselt.

Neben seiner Funktion als Pore übernimmt der Sec61-Komplex auch die Aufgabe eines zweiten Signalsequenz-Kontrollmechanismus (Jungnickel und Rapoport, 1995). Bei einer Kettenlänge von 70 Aminosäuren und einer korrekten Signalsequenz wird die Bindung des Ribosoms an die Membran Hochsalz-resistent, öffnet sich der Translokationstunnel, und ein proteolytischer Abbau der naszierenden Polypeptidkette ist nicht mehr möglich (Connolly et al., 1989b). All dies sind Hinweise darauf, daß aufgrund einer Interaktion einer korrekten Signalsequenz mit Teilen des Sec61-Komplexes eine Konformationsänderung initiiert wird, die eine Öffnung der Pore bewirkt (Jungnickel und Rapoport, 1995).

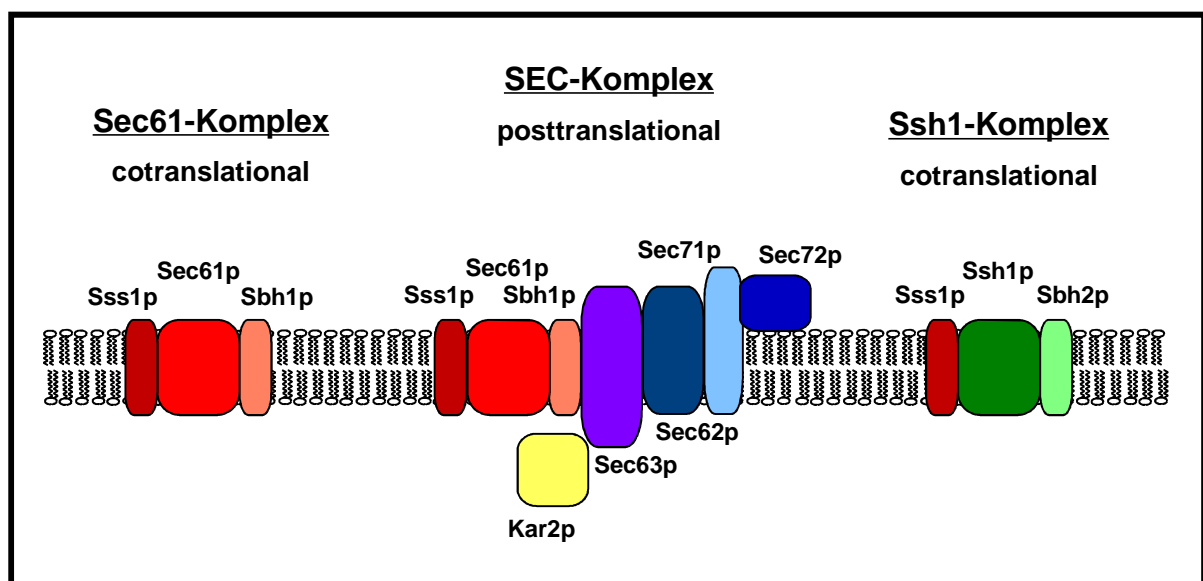
Der Sec61-Komplex der Säuger besteht aus drei Untereinheiten Sec61 $\alpha$  (52 kD), Sec61 $\beta$  (10 kD) und Sec61 $\gamma$  (8 kD). Görlich und Rapoport (1993) zeigten, daß der Sec61-Komplex zusammen mit dem SRP-Rezeptorkomplex und TRAM (TRanslocating chain Associated Membrane protein) ausreicht, um die Translokation von Proteinen in gereinigte Proteoliposomen zu rekonstituieren. TRAM ist nur für eine Gruppe von Proteinen erforderlich (Voigt et al., 1996).

Homologe des Sec61-Komplexes hat man in allen bisher untersuchten Organismen gefunden (Hartmann et al., 1994; Pohlschröder et al., 1997).

Während die Translokation in Säugermembranen cotranslational erfolgt, kennt man in der Hefe *S.cerevisiae* und in *E.coli* auch einen posttranslationalen Transport. Dazu sind weitere Membranproteine erforderlich, die in den folgenden Kapiteln näher beschrieben werden.

### 1.3 Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* besitzt drei unabhängige Proteinkomplexe zur Translokation in das ER

Aufgrund des vollständig entschlüsselten Genoms der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und den genetischen sowie biochemischen Untersuchungsmöglichkeiten, die dieser eukaryontische Modellorganismus bietet, gehören die Translokationssysteme in das ER von *S. cerevisiae* zu den am Besten untersuchten. Insgesamt gibt es drei unabhängige Komplexe, die schematisch in Abb. 1 dargestellt sind (siehe auch Falteinlage am Ende der Arbeit).



**Abb. 1:** Die Hefe *S. cerevisiae* hat drei verschiedene Translokationskomplexe für den ER-Import. Der trimere Sec61-Komplex (rötlich eingefärbt) spielt eine zentrale Rolle. Als eigenständiger Komplex ist er essentiell für den cotranslationalen Transport. Zusammen mit dem Sec62/63-Subkomplex (bläulich eingefärbt) bildet er den zur posttranslationalen Translokation fähigen SEC-Komplex. Das luminaire Hsp70-Homologe Kar2p (gelb) ist ebenfalls ein wichtiger Bestandteil des posttranslationalen Transportmechanismus. Der Ssh1-Komplex (grünlich/rötlich eingefärbt) ist nicht essentiell. Er assoziiert nicht mit dem Sec62/63-Subkomplex und hat vermutlich eine Rolle bei der Regulation der Proteinsekretion in das ER.

Wie im Säuger, besteht die funktionelle Grundeinheit des Hefe-Translokons aus dem trimeren Sec61-Komplex. Sec61p (53 kD), Sbh1p (Sec sixty-one  $\beta$  homolog, 14 kD) und Sss1p (Sec sixty-one suppressor, 8 kD) zeigen starke Homologien zu Sec61 $\alpha$ , Sec61 $\beta$  bzw. Sec61 $\gamma$  sowie

zum SecYEG-Komplex in *E.coli* (siehe Abb. 2, Seite 23). Die Gene *SEC61* und *SSS1* sind essentiell für die Hefe. *SSS1* wurde als high-copy Suppressor eines temperatursensitiven Allels für Sec61p gefunden (Esnault et al., 1993) und kann durch das Säuger Sec61 $\gamma$  funktionell ersetzt werden (Hartmann et al., 1994). Sec61p besitzt zehn Transmembranbereiche (Wilkinson et al., 1996), wobei beide Termini im Cytosol lokalisiert sind. Chemische Quervernetzungsexperimente haben ergeben, daß Sss1p mit den Transmembrandomänen TM6, TM7 und TM8 von Sec61p interagiert (Wilkinson et al., 1996b). Sss1p und Sbh1p sind Typ II Membranproteine mit jeweils einem Transmembranbereich nahe dem C-Terminus.

Nach Ergebnissen von Plath et al. (1998) sind vor allem die Transmembrandomänen TM2 und TM7 von Sec61p an einer Interaktion mit der Signalsequenz beteiligt. Dabei scheint die Signalsequenz des Modellsubstrats  $\alpha$ -Faktor in einer genau definierten Konformation innerhalb der Pore ausgerichtet zu sein. Diese Protein-Protein-Wechselwirkung könnte somit die Grundlage für den abschließenden Kontrollmechanismus vor dem Membrandurchtritt sein. Diese Sichtweise wird durch SecY-Mutanten (prlA-Mutanten) aus *E.coli* unterstützt, die in den homologen Transmembrandomänen mutiert und im Signalerkennungsschritt defekt sind (Osborne und Silhavy, 1993).

In einem von Plath et al. (1998) erstellten Modell nimmt Sss1p in Abwesenheit einer Signalsequenz deren Platz ein und muß durch Konkurrenz während der Signalsequenzerkennung durch diese verdrängt werden. Eine damit einhergehende Konformationsänderung könnte Teil des Öffnungsmechanismus sein.

*Saccharomyces cerevisiae* besitzt einen zweiten trimeren Translokationskomplex, den SSH1-Komplex. Die beiden Komponenten Ssh1p (Sec sixty-one homolog, 53,3 kD) und Sbh2p (Sec sixty-one beta homolog, 9,6 kD) zeigen eine ausgeprägte Sequenzhomologie zu Sec61p (32% Identität der Aminosäuren) bzw. zu Sbh1p (52% Identität der Aminosäuren). Die dritte Komponente der beiden trimeren Translokationskomplexe ist mit Sss1p identisch (Finke et al., 1996).

Weder *SSH1* noch *SBH2*, noch die Kombination aus beiden Genen ist essentiell für die Zelle (Finke et al., 1996). Aus der Essentialität von *SEC61* läßt sich ableiten, daß *SSH1* bzw. der Ssh1-Komplex nicht für *SEC61* bzw. den Sec61-Komplex komplementieren kann. Durch die Präparation sogenannter 'Ribosomen assoziierter Membranproteine' (RAMP) weiß man, daß sich auch der Ssh1-Komplex Ribosomen-gebunden isolieren läßt. Dies ist neben der starken Homologie zum Sec61-Komplex ein weiterer Hinweis auf eine cotranslationale Funktion

(Finke et al., 1996). Man nimmt an, daß der Ssh1-Komplex eine regulatorische Funktion übernimmt und vielleicht dazu dient, das Verhältnis zwischen co- und posttranslationalem Transport zu beeinflussen. Vorstellbar wäre auch eine Substratspezifität der beiden cotranslationalen Komplexe, wobei das Ribosom mit der naszierenden Kette dann zwischen dem Ssh1-Komplex und dem Sec61-Komplex unterscheiden können müßte.

Der heptamere SEC-Komplex ist in der Lage, Proteine posttranslational zu transportieren (Panzner et al., 1995; Matlack et al., 1997, 1999). Dabei wird der SEC61-Komplex durch den tetrameren Sec62/63-Subkomplex ergänzt (Deshaies et al., 1991; Panzner et al., 1995; Wittke et al., 1999). Der Sec62/63-Subkomplex besteht aus den vier Proteinen: Sec62p, Sec63p, Sec71p und Sec72p.

Man geht davon aus, daß der Proteintransport auch im SEC-Komplex durch den von Sec61p geformten Tunnel erfolgt, und daß der Sec62/63-Subkomplex die für einen posttranslationalen Transport zusätzlichen Funktionen übernimmt. Der Sec62/63-Subkomplex ist – ebenso wie Ribosomen – fähig, den Sec61-Komplex zu den in der Elektronenmikroskopie beobachteten quasipentagonalen Strukturen zusammenzulagern (Hanein et al., 1996). Eine heptamere Zusammenlagerung von Sec62/63- und Ssh1-Komplex ist nicht bekannt.

Die posttranslationale Translokation kann man in zwei unabhängige Schritte unterteilen. Zum einen den ATP- und BiP-unabhängigen Bindungsprozeß der Signalsequenz an den SEC-Komplex, und zum anderen die eigentliche Translokation, die ATP und BiP bedarf (Lyman und Schekman, 1995, 1997; Matlack et al., 1997, 1999; Misselwitz et al., 1998).

Sec63p (73 kD) ist ein essentielles, integrales Membranprotein mit drei Transmembrandomänen, dem C-Terminus im Cytoplasma und einer DnaJ-Domäne in der luminalen Schleife (Sadler et al., 1989; Feldheim et al., 1992). Eine Interaktion der DnaJ-Domäne mit dem luminalen HSP70-Homologen BiP/Kar2p wurde sowohl genetisch (Scidmore, 1993) als auch biochemisch (Lyman und Schekman, 1995; Matlack et al., 1997, 1999; Misselwitz et al., 1998) bewiesen. Neueste Studien haben den Wirkungsmechanismus von Sec63p und BiP sehr genau aufgeklärt. Im ATP-Zustand bindet BiP an die DnaJ-Domäne des Sec63p. Ist die Polypeptidkette eines zu translozierenden Proteins in unmittelbarer Nähe, wird BiP unter ATP-Hydrolyse mit geringer Sequenzspezifität auf das Polypeptid übertragen (Misselwitz et al., 1998).

Offen war lange Zeit die Frage, woher die Energie für den posttranslationalen Membrandurchtritt kommt und wie sie umgesetzt wird. Experimente von Matlack et al. (1999) bestätigen sehr eindrucksvoll das Prinzip der Brownschen Ratsche. Dabei diffundiert die Polypeptidkette innerhalb des Translokons hinein und heraus. Durch sukzessives

Anlagern von mehreren BiP wird das Zurückgleiten aus dem Lumen verhindert, während das weitere Hineindiffundieren nicht gehemmt wird. Interessanterweise kann *in vitro* die Funktion von BiP durch spezifische Antikörper gegen verschiedene Regionen eines Transportsubstrats simuliert werden (Matlack et al., 1999).

*SEC62* ist – wie *SEC61*, *SSS1* und *SEC63* – essentiell für das Wachstum der Zelle unter Standardbedingungen. *SEC62* codiert für ein 32 kD großes, integrales Membranprotein mit zwei Transmembrandomänen und beiden Termini im Cytosol. Sowohl der N- als auch der C-Terminus ist essentiell (Deshaies et al., 1989, 1990). Außerdem haben Deshaies et al. (1989) gezeigt, daß ein  $\Delta sec62$ -Stamm bei 17°C wächst und seine Membranen in *in vitro* Translationsexperimenten funktionsfähig sind. Das läßt darauf schließen, daß Sec62p vor allem eine stabilisierende Wirkung auf den SEC-Komplex besitzt (Deshaies et al., 1989). Membranen aus einem  $\Delta sec62$ -Stamm zeigen deutliche Unterschiede im Transportdefekt bei verschiedenen Substraten. Während es zur Akkumulation von Präkursoren von Carboxypeptidase Y und Präpro- $\alpha$ -Faktor kommt, ist die Translokation von Prä-Invertase nicht eingeschränkt (Deshaies et al., 1989).

Mit Hilfe des sogenannten Ubiquitin-split-assays, einer Abwandlung des Two-hybrid-assays (Johnsson und Varshavsky, 1994), haben Dünnwald et al. (1999) *in vivo* eine unmittelbare Nähe von Präpro- $\alpha$ -Faktor und Sec62p zeigen können, die Interaktion für ein Invertase-Fusionsprotein war dagegen deutlich geringer, was die oben beschriebenen Unterschiede im Transportdefekt unterstreicht. Zu gleichen Ergebnissen kommen auch Lyman und Schekman (1997), die ein Modell entwickelten, wonach Sec62p zusammen mit Sec71p und Sec72p die Signalsequenzantenne für posttranslationale Transportsubstrate bildet.

Demnach würde der Sec62/63-Subkomplex zwei unterschiedliche Funktionen übernehmen, die man eindeutig verschiedenen Proteinen dieses Komplexes zuordnen kann. Während ein cytosolisch orientierter Komplex aus Sec62p, Sec71p und Sec72p eine Rolle bei der Bindung der Signalsequenz spielt, übernimmt Sec63p die Vermittlung der Interaktion zwischen der translozierenden Polypeptidkette und BiP als Molekularer Ratsche.

Sowohl Sec71p (früher Sec66p) als auch Sec72p wurden durch unterschiedliche Arbeitsgruppen parallel identifiziert. N. Green et al. (1992) fanden *SEC71* und *SEC72* in einem genetischen Screen und wiesen Transportdefekte in Deletionsmutanten nach. Unter der Bezeichnung *HSSI* (high copy suppressor von sec63-101) wurde *SEC71* in einem unabhängigen Screen von Kurihara und Silver (1993) entdeckt. Bei *sec63-101* handelt es sich um eine Mutante im cytosolischen Bereich von Sec63p, andere Mutanten von *SEC63* werden

durch Überexpression von Sec71p nicht komplementiert. Aus weiteren Experimenten geht hervor, daß die letzten 30 Aminosäuren des Sec71p für die Komplementation notwendig sind (Kurihara und Silver, 1993).

Neben der Identifizierung durch genetische Screens wurden beide Proteine auch durch die Assoziation mit Sec61p, Sec62p, Sec63p proteinchemisch als p23 (= Sec72p) und gp31,5 (=Sec71p) aufgereinigt. Sec71p und Sec72p können sowohl zueinander als auch zu Sec61p, Sec62p und Sec63p chemisch quervernetzt werden (Deshaies et al., 1991, Feldheim et al., 1992).

Sec71p ist ein integrales Membranprotein, sein N-Terminus liegt im ER-Lumen und ist zweifach glykosyliert. Die ER-Lokalisierung von Sec71p wurde per Immunfluoreszenz nachgewiesen (Feldheim et al., 1993; Kurihara und Silver, 1993). Sec72p ist das einzige Protein des heptameren SEC-Komplexes, das keinen Membrananker besitzt und als peripheres Membranprotein mit dem SEC-Komplex assoziiert ist. Sein Verhalten ist untypisch für ein peripheres Membranprotein und entspricht eher dem eines integralen Membranproteins, denn die Assoziation an die Membran ist Hochsalz- und Alkali-resistent (500 mM NaCl bzw. pH 11) und auch unter 0,8 M Harnstoff stabil (Feldheim et al., 1994).

Keines der beiden Proteine ist essentiell für die Zelle bei 30°C. Eine Nullmutante von *SEC71* ist bei 37°C letal (Kurihara und Silver, 1993; Feldheim et al., 1993).

Interessanterweise ist in einer *sec71*-Deletionsmutante kein Sec72p nachweisbar (Feldheim et al., 1993, 1994; Fang und Green, 1994), sondern wird – wie durch radioaktive Markierungsexperimente nachgewiesen – mit einer Halbwertszeit von 12 min degradiert (Feldheim et al., 1994). Sec71p scheint somit einen stabilisierenden Einfluß auf Sec72p zu haben.

Neben der gemeinsamen Aufreinigung mit den anderen Komponenten des SEC-Komplexes und der Entdeckung in genetischen Screens gibt es weitere Daten, die eine Beteiligung von Sec71p und Sec72p am Translokationsprozeß unterstützen. Der Begriff der synthetischen Letalität beschreibt den Umstand, daß sich zwei Defekte, die jeder für sich einzeln nicht letal sind, in einem gemeinsamen Stoffwechsel- oder Transportweg der Zelle zu einem letalen Phänotypen verstärken können, während sie es nicht tun, wenn sie in zwei unabhängigen Prozessen auftreten (Huffacker et al., 1987).

Eine synthetische Letalität von einer *sec71* Deletionsmutante mit den temperatursensitiven Mutanten *sec61-2*, *sec62-1*, *sec63-1* und *sec63-101* wurde bei 23°C erzielt, mit *kar2-159* und *sec65-1* bei 30°C. Eine synthetische Letalität mit der Glykosylierungsmutanten *sec59-1* gibt es mit *sec71* nicht (Kurihara und Silver, 1993).



*Sec72-1* (Stopcodon an Pos. 76 von 193) zeigt in Kombination mit *kar2-159* und *sec65-1* keinen synthetisch-letalen Effekt und ist somit in den Auswirkungen auf den Transportprozeß nicht so bedeutend wie  $\Delta sec71$  (Fang und Green, 1994).

*Sec72-1* zeigt auch sonst keinen starken Wachstumsdefekt, akkumuliert aber Präpro-CPY bei 30°C (Fang und Green, 1994). Feldheim et al. (1994) haben außerdem gezeigt, daß Invertase nicht akkumuliert wird, und daß die Akkumulation von Transportsubstraten abhängig ist von den Signalsequenzen.

Wie zu erwarten, sind die Präkursorakkumulationen in einem  $\Delta sec71$ -Hintergrund stärker als in einem  $\Delta sec72$ -Hintergrund, da – wie bereits erwähnt – in Abwesenheit von Sec71p auch kein Sec72p stabil an den SEC-Komplex gebunden wird. In einem *sec71*-Stamm findet man Akkumulation von pre-Kar2p und Prä-Invertase, wenn die Hefen kurz vor der Analyse zu der letalen Temperatur von 37°C umgesetzt werden. Außerdem wurden Transportdefekte für Präpro- $\alpha$ -Faktor und Präpro-CPY gefunden (Feldheim et al., 1993; Kurihara und Silver, 1993).

#### **1.4 Die Translocase in Escherichia coli**

Analog zur Proteintranslokation in das Endoplasmatische Retikulum von Eukaryonten ist der Proteinexport bei Prokaryonten. Ein Vergleich der beiden Systeme läßt klar erkennen, daß es sich um einen fundamentalen Prozeß mit homologen Proteinen handelt, der lediglich auf die individuellen Bedürfnisse des jeweiligen Organismus angepaßt worden ist.

Das Sec-Translokon von *E.coli* besteht aus 7 Proteinen: dem heterotrimeren SecYEG-Komplex, SecD, SecE und YajC als assoziierte Membranproteine, sowie dem homodimeren SecA. Während bei der cotranslationalen Translokation die Energie durch die Synthese des Polypeptids bereitgestellt wird, und bei der posttranslationalen Translokation in *S.cerevisiae* die ATP-getriebene molekulare Ratsche aus Sec63p und BiP für den Antrieb sorgt, findet bei der posttranslationalen Translokation in *E.coli* ein anderer Mechanismus Anwendung. Dies ist auch deshalb zwingend notwendig, da im periplasmatischen Raum kein ATP für eine Molekulare Ratsche zur Verfügung steht.

Durch wiederholte Insertion und Reinsertion von SecA wird das Transportsubstrat schrittweise durch die Membranpore geschoben (Economou und Wickner, 1994; Kim et al., 1994; Eichler und Wickner, 1997; Ramamurthy und Oliver, 1997). Die Energie wird durch ATP-Hydrolyse geliefert. Mit dem ATP/ADP-Zyklus wird das Binden bzw. Lösen vom Transportsubstrat erklärt (Economou et al., 1995). Ein Protonengradient unterstützt dabei den

Translokationsmechanismus von SecA (Eichler et al., 1998).

SecY zeigt deutliche Sequenzhomologie zu Sec61 $\alpha$  aus Säugern bzw. Sec61p aus *S.cerevisiae* und bildet mit 10 Transmembrandomänen den Hauptteil der Pore. Meyer et al. (1999) konnten durch elektronenmikroskopische Studien zeigen, daß der SecYEG Komplex analog zu den bekannten eukaryontischen Komplexen quasi-pentagonale Strukturen in der Membran ausbildet.

SecY ist genauso essentiell für den Translokationsprozeß wie SecE, wobei nur der dritte Transmembranbereich von SecE ausreicht, um einen Deletionsstamm zu komplementieren (Schatz et al., 1991). Dieser essentielle Teil ist homolog zu Sec61 $\gamma$  (Säuger) bzw. Sss1p (Hefe), die beide jeweils nur einen Transmembranbereich besitzen.

In Rekonstitutionsexperimenten wurde gezeigt, daß SecG nicht unbedingt essentiell für den Import in rekonstituierte Proteoliposomen ist, den Prozeß aber deutlich stimuliert (Brundage et al., 1990; Hanada et al., 1994). Nach neuesten Ergebnissen nimmt man an, daß SecG mit seinen zwei Membranankern eine sehr drastische Konformationsänderung erfährt und damit die Inversion/Reinversion von SecA in die Membran unterstützt (Nishiyama et al., 1996). Eine Verwandtschaft von SecG zu Sec61 $\beta$  bzw. Sbh1p oder Sbh2p ist nicht vorhanden.

Auch für den SecYEG-Komplex wird, wie schon für Sec61 $\alpha$  im Säugersystem erwähnt, ein Kontrollmechanismus zur Überprüfung der korrekten Signalsequenz angenommen (Osborne und Silhavy, 1993).

Die assoziierten Membranproteine SecD, SecF und YajC wurden in *in vitro* Translations-systemen als nicht essentiell befunden (Brundage et al., 1990; Driessen, 1992; Hanada et al., 1994). *In vivo* Studien in Deletionsstämmen dagegen befürworten eine stabilisierende Wirkung auf die Insertion von SecA und führen zu der Hypothese, daß SecD, SecF und YajC daran beteiligt sind, die Translokation in eine Richtung zu forcieren. In diesem Zusammenhang wird auch die Notwendigkeit eines Protonengradienten zur effektiven Translokation von Proteinen diskutiert (Duong und Wickner, 1997).

Abb. 2 zeigt abschließend eine Auflistung der auf Sequenzhomologie basierenden Parallelen zwischen Eukaryonten (Säuger und *S.cerevisiae*), Prokaryonten und Archaea.

<b>Funktion</b>	<b>Komponente</b>	<b>Säuger</b>	<b>Hefen</b> <i>S.cerevisiae</i>		<b>Bakteria</b> <i>E.coli</i>	<b>Archae</b>
<b>Targeting</b>	<b>SRP</b>	7S-RNA SRP9 SRP14 SRP19  SRP54 SRP68 SRP72	scR1 - Srp14p Srp65p Srp21p Srp54p Srp68p Srp72p		4.5S-RNA     P48, Ffh	SRP-RNA   SRP19  SRP54
	<b>SecB</b>		—		SecB	
	<b>SRP-Rezeptor</b>	SR $\alpha$ SR $\beta$	SR $\alpha$ (SR101) SR $\beta$		FtsY	SR $\alpha$
<b>Trans- lokation</b>	<b>Sec61-Komplex</b>	Sec61 $\alpha$ Sec61 $\beta$ Sec61 $\gamma$	Sec61p Sbh1p Sss1p	Ssh1p Sbh2p Sss1p	SecY  SecE SecG	Sec61 $\alpha$ ? Sec61 $\gamma$
	<b>Sec62/63-Komplex</b>	HTP1/SEC62 SEC63	Sec62p Sec63p Sec71p Sec72p			
	<b>TRAM</b>	TRAMP	?			
	<b>SecD/F/YajC</b>		— — —		SecD SecF YajC	SecD ?
	<b>BiP</b>	BiP	Kar2p			
	<b>SecA</b>		—		SecA	

**Abb. 2:** Vergleich der wichtigsten Komponenten für den Proteintransport durch die eukaryontische ER-Membran (Säuger; *S.cerevisiae*) bzw. prokaryontische Plasmamembran (*E.coli*; Archaea).

## 1.5 Zielsetzung

Der Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* besitzt drei unabhängige Translokationsorte für den Transport von Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum bzw. dessen Membran. Durch genetische Analysen, gemeinsame proteinchemische Aufreinigung und biochemische Analyse-Methoden ist die Zusammensetzung der einzelnen Komplexe, sowie die Funktion von einigen zentralen Komponenten der Translokationskomplexe bekannt. Homologie-Vergleiche mit anderen Organismen ergänzen das Wissen um Funktion und Interaktion der einzelnen Proteine.

Zu Sec71p und Sec72p, zwei Proteinen des posttranslationalen Transportwegs, sind bisher keine homologen Proteine in höheren Eukaryonten oder Prokaryonten bekannt. Des weiteren sind die Gene *SEC71* und *SEC72* unter normalen Bedingungen nicht essentiell für das Zellwachstum. Das Modell des Signalsequenz-Antennenkomplexes postuliert für Sec71p und Sec72p eine Beteiligung an einem frühen Schritt der posttranslationalen Translokation.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es die Funktion einzelner Domänen von Sec71p und Sec72p genauer zu untersuchen, um ihre Einbindung in den posttranslationalen Transport besser zu verstehen. Darüber hinaus soll das erweiterte Wissen über die Funktionsweise von Sec71p und Sec72p zu einem besseren Verständnis des Gesamtprozesses führen.

Aufgrund der cytosolischen Ausrichtung der beiden Proteine ist es naheliegend eine mögliche Interaktion mit cytosolischen Faktoren des posttranslationalen Targeting-Mechanismus zu untersuchen. In dieser Arbeit wird mit zwei unabhängigen experimentellen Ansätzen versucht Interaktionspartner von Sec72p zu identifizieren. Ein weiteres Produkt dieser Arbeit sind Aussagen über die Notwendigkeit von Sbh1p im posttranslationalen Transport. Das Einordnen dieser Resultate in einen Gesamtkontext führt zu einer neuen Sichtweise der Rolle von Sbh1p im Translokationsprozeß.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verwendete Hefestämme

Stamm	Genotyp	Parental-Stamm	Referenz
YTX 57	mat $\alpha$ , his3-11,-15, leu2-3,-112, trp1-1, ura3-1, ade2-1, can1-100	YTX 69, Tetradenanalyse	T. Sommer C. Volkwein
YTX 58	mat a, his3-11,-15, leu2-3,-112, trp1-1, ura3-1, ade2-1, can1-100	YTX 69, Tetradenanalyse	T. Sommer C. Volkwein
YTX 69	mat a/ $\alpha$ , his3-11,-15/his3-11,-15, leu2-3,-112/leu2-3,-112, trp1-1/trp1-1, ura3-1/ura3-1, ade2-1/ade2-1, can1-100/can1-100		Hartmann et al., 1994
YUC 1	mat a/ $\alpha$ , $\Delta sbh1::HIS3$ /his3-11,-15, $\Delta sec71::LEU2$ /leu2-3,-112, trp1-1/trp1-1, ura3-1/ura3-1, ade2-1/ade2-1, can1-100/can1-100	YTX 69	Diese Arbeit
YUC 2	mat $\alpha$ , $\Delta sbh1::HIS3$ /his3-11,-15, $\Delta sec71::LEU2$ /leu2-3,-112, trp1-1/ura3-1, ade2-1, can1-100	YUC 1 + pSBH1 und Tetradenanalyse	Diese Arbeit
YUC 3	mat a/ $\alpha$ , $\Delta sbh2::ADE2$ /ade2-1, $\Delta sec71::LEU2$ /leu2-3,-112, his3-11,-15/his3-11,-15, trp1-1/trp1-1, ura3-1/ura3-1, can1-100/can1-100	YTX 69	Diese Arbeit
YUC 4	mat $\alpha$ , $\Delta sbh1::HIS3$ /his3-11,-15, $\Delta sec71::LEU2$ /leu2-3,-112, trp1-1, ura3-1, $\Delta ssh1::ADE2$ /ade2-1, can1-100	YUC2/pSBH1::URA3, $\Delta ssh1$ -Transformation und 5 FOA-Selektion	Diese Arbeit
YUC 6	mat a, $\Delta sec72::TRP1$ /trp1-1, his3-11,-15, leu2-3,-112, ura3-1, ade2-1, can1-100, ssd1-d	K 699	Diese Arbeit
YUC 7	mat $\alpha$ , $\Delta sec72::TRP1$ /trp1-1, his3-11,-15, leu2-3,-112, ura3-1, ade2-1, can1-100, ssd1-d	K 700	Diese Arbeit
YUC 8	mat $\alpha$ , $\Delta sbh2::HIS3$ /his3-11,-15, leu2-3,-112, $\Delta sec72::TRP1$ /trp1-1, ura3-1, ade2-1, can1-100	YKF 11 + $\Delta sec72$ -Transformat.	Diese Arbeit
YUC 9	mat $\alpha$ , $\Delta sbh1::HIS3$ /his3-11,-15, $\Delta sec72::TRP1$ /trp1-1, $\Delta sbh2::ADE2$ /ade2-1, ura3-1, leu2-3,-112, can1-100	YKF16/pSBH1::URA3 + $\Delta sec72$ -Transformat.	Diese Arbeit
YUC 10	mat $\alpha$ , $\Delta sbh1::HIS3$ /his3-11,-15, $\Delta sbh2::ADE2$ /ade2-1, $\Delta sec71::LEU2$ /leu2-3,-112, ura3-1, trp1-1, can1-100	YKF16/pSBH1::URA3 + $\Delta sec71$ -Transformat.	Diese Arbeit
YUC 11	mat a, $\Delta sec71::LEU2$ /leu2-3,-112, his3-11,-15, trp1-1, ura3-1, ade2-1, can1-100	YUC 1, Tetradenanalyse	Diese Arbeit

YUC 12	mat $\alpha$ , $\Delta sec71::LEU2/leu2-3,-112$ , his3-11,-15, trp1-1, ura3-1, ade2-1, can1-100	YUC 1, Tetradenanalyse	Diese Arbeit
YUC 13	mat a, $\Delta sec71::LEU2/leu2-3,-112$ , $\Delta sec72::TRP1/trp1-1$ , his3-11,-15, ura3-1, ade2-1, can1-100	YUC 6 + $\Delta sec71$ -Transformation	Diese Arbeit
YUC 14	mat a, $\Delta sec71::LEU2/leu2-3,-112$ , $\Delta sbh2::ADE2/ade2-1$ , his3-11,-15, trp1-1, ura3-1, can1-100	YTX 69, Tetradenanalyse	Diese Arbeit
YUC 15	mat a, $\Delta sec72::TRP1/trp1-1$ , $\Delta sbh1::HIS3/his3-11,-15$ , leu2-3,-112, ade2-1, ura3-1, can1-100	Kreuzung YUC 6 x YKF8, Tetradenanalyse	Diese Arbeit
YUC 16	mat $\alpha$ , $\Delta sbh2::HIS3/his3-11,-15$ , $\Delta sec72::TRP1/trp1-1$ , $\Delta ade3$ , ade2-1, leu2-3,-112, ura3-1, can1-100	YUC 8 + $\Delta ade3$ -Transformation	Diese Arbeit
YKF 8	mat $\alpha$ , $\Delta sbh1::HIS3/his3-11,-15$ , leu2-3,-112, trp1-1, ura3-1, ade2-1, can1-100	YKF 7	K. Finke et al., 1996
YKF 9	mat $\alpha$ , $\Delta sbh2::ADE2/ade2-1$ , his3-11,-15, leu2-3,-112, trp1-1, ura3-1, can1-100	YKF 7	K. Finke et al., 1996
YKF 11	Mat a, $\Delta sbh2::HIS3/his3-11,-15$ , leu2-3,-112, trp1-1, ura3-1, ade2-1, can1-100	YTX 69, Tetradenanalyse	K. Finke et al., 1996

### 2.1.2 Verwendete Plasmide

Name	Beschreibung	Wirtsstamm	Klon, Datum
pYPGE2	Hefe-Expressionsvektor, 2 $\mu$ , TRP1-Marker, Amp, Phosphoglyceratkinase-Promotor, Multi-cloning-site	TOP 10	Brunelli u. Pall, 1993
pYPGE2-LEU	Hefe-Expressionsvektor, 2 $\mu$ , LEU2-Marker, Amp, Phosphoglyceratkinase-Promotor, Multi-cloning-site	TOP 10	v. 5/96
pYPGE2-URA	Hefe-Expressionsvektor, 2 $\mu$ , URA3-Marker, Amp, Phosphoglyceratkinase-Promotor, Multi-cloning-site	TOP 10	v. 5/96
pCU 012	SEC61 $\beta$ im pBS	XL1-blue	Klon B-17 v. 18.8.94
pCU 025	SEC72 im pBS	XL1-blue	Klon M5-4 v. 26.1.96
pCU 028	SEC71 im pBS	XL1-blue	Klon M8-7 v. 26.1.96
pCU 029	SEC71 im pYPGE2	TOP 10	Klon 29-14 v. 2.4.96
pCU 033	SEC72 im pYPGE2	TOP 10	M15-21 v. 15.2.96

pCU 045	<i>SEC71</i> im pYPGE2-LEU	TOP 10	M 9-1 v. 28.6.96
pCU 046	<i>SEC72</i> im pYPGE2-LEU	TOP 10	M 3-1 v. 28.6.96
pCU 047	<i>SBH1</i> im pYPGE2	TOP 10	Klon 47-4 v. 25.6.96
pCU 049	<i>SBH2</i> im pYPGE2	TOP 10	Klon 3-1 v. 17.7.96
pCU 050	<i>SBH2</i> im pRS426-MET	TOP 10	Klon 1-2 v. 18.7.96
pCU 051	<i>SBH1</i> im pRS426-MET	TOP 10	Klon 5-12 v. 18.7.96
pCU 056	<i>SBH1</i> im pRS426-Met mit TRP-Marker	TOP 10	Klon 7-34 v. 18.7.96
pCU 057	<i>SBH2</i> im pRS426-Met mit TRP-Marker	TOP 10	Klon 8-15 v. 18.7.96
pCU 060	$\Delta sec71$ -Konstrukt im pGEM-T	XL-I blue	Klon #20 v. 22.10.96
pCU 061	Endogenes <i>SEC72</i> full-length im pRS415	TOP 10	Klon SS2 v. 23.9.96
pCU 062	Hintere Flanke des <i>SEC72-ΔTPR</i> -Konstruktes im pRS415	TOP 10	Klon SB4 v. 23.9.96
pCU 063 neu	<i>SEC61β</i> im pRS426-GAL10	TOP 10	Klon 4-1 v. 9.10.96
pCU 065	<i>SEC72-ΔTPR</i> -Konstrukt im pRS415	TOP 10	Klon 2-1 v. 9.10.96
pCU 066	<i>SEC72-HIS<sub>6</sub></i> im pQE60	BL21	Klon 63 v. 12/96
pCU 073	<i>SEC72</i> im Vektor für <i>in vitro</i> Transkription	TOP 10	Klon 73-3 v. 27.1.97
pCU 085	Synth. Letaler Screen: <i>SEC72</i> im pJF14 (Mutationsplasmid)	TOP 10	Klon 85-4 v. 17.12.98
pCU 088	Synthetisch letaler Screen: <i>SEC72</i> im pJF 14 (Testplasmid)	TOP 10	Klon E3 v. 7.7.98
pCU 093	3x myc-tag im pYPGE2-Ura	TOP10	Klon 8-1 v. 8.10.98
pCU 098	<i>SBH1</i> im pRS414-GAL unter Kontrolle des GAL10-Promotors.	TOP 10	Klon 2 v. 15.3.99
PCU 099	<i>SBH1</i> im pRS415-GAL unter Kontrolle des GAL10-Promotors.	TOP 10	Klon R18 v. 8.6.99

pCU 100	<i>SEC71</i> -120 + 3x myc-Epitop N-terminal im pYPGE2-Ura	TOP10	Klon 120-2 v. 4.12.98
pCU 101	<i>SEC71</i> -160 + 3x myc-Epitop N-terminal im pYPGE2-Ura	TOP10	Klon 160-2 v. 4.12.98
pCU 102	<i>SEC71</i> -170 + 3x myc-Epitop N-terminal im pYPGE2-Ura	TOP10	Klon 170-2 v. 4.12.98
pCU 103	<i>SEC71</i> -180 + 3x myc-Epitop N-terminal im pYPGE2-Ura	TOP10	Klon 180-2 v. 4.12.98
pCU 104	<i>SEC71</i> -206 + 3x myc-Epitop N-terminal im pYPGE2-Ura	TOP 10	Klon 206-2 v. 4.12.98
pCU 105	<i>SUC2</i> (Invertase) im pYPGE2-Ura, konstitutiv expremiert	TOP 10	Klon 17 v. 21.8.99
pCU 106	Fusionskonstrukt aus P450Cm1 (1-132bp) + <i>SEC71</i> (241-618bp) im pYPGE2-URA	TOP 10	Klon A105 v. 21.9.99
pCU 107	Fusionskonstrukt aus P450Cm1 (1-132bp) + <i>SEC71</i> (361-618bp) im pYPGE2-URA	TOP 10	Klon B88 v. 21.9.99
pCU 108	Fusionskonstrukt aus P450Cm1 (1-132bp) + <i>SEC71</i> (481-618bp) im pYPGE2-URA	TOP 10	Klon C6 v. 21.9.99
pCU 109	Fusionskonstrukt aus 3x myc-tag + <i>P450Cm1</i> (1-132bp) + <i>SEC71</i> (241-618bp) im pYPGE2-URA	TOP 10	Klon +D4 v. 19.10.99
pCU 110	Fusionskonstrukt aus 3x myc-tag + <i>P450Cm1</i> (1-132bp) + <i>SEC71</i> (361-618bp) im pYPGE2-URA	TOP 10	Klon E29 v. 19.10.99
pCU 111	Fusionskonstrukt aus 3x myc-tag + <i>P450Cm1</i> (1-132bp) + <i>SEC71</i> (481-618bp) im pYPGE2-URA	TOP 10	Klon F71 v. 19.10.99
P450 Cm1j	Cm1(1-44)/Inv <sup>c</sup> Konstrukt im Yep51, PCR-Template für den Membrananker von <i>P450</i> aus <i>Candida maltosa</i>	DH5αC	R. Menzel et al., 1996

### 2.1.3 Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz	Verwendung
71-120	CCG GTA CCC TAT AGA AGG TTT ATC TGA GGA G	C-term. verkürztes <i>SEC71</i> -120
71-160	ATG GTA CCC TAA ACC CAG CCC GGT TGC AAT C	C-term. verkürztes <i>SEC71</i> -160
71-170	CCG GTA CCC TAA ATT TCT TTA CAA ACC ATA ACG	C-term. verkürztes <i>SEC71</i> -170
71-180	CCG GTA CCC TAA TAA CGT CTA GAG AGA GC	C-term. verkürztes <i>SEC71</i> -180



CMU 016 neu	GCA GGA TCC CGG CCA TGG TTA CCC TTG AAT AC	Amplifikation von <i>SEC72</i> (s)
CMU 017 neu	CCG CTC GAG GGT TAT GCA CCT TAT TCA CCG	Amplifikation von <i>SEC72</i> (as)
CMU 023	GGA TCC CTT GAG TTT ACC AAT ATG TCC G	Amplifikation von <i>SEC71</i> (s)
CMU 024	GGT ACC GTA GTG AGC AAG AAG AAG GGT AG	Amplifikation von <i>SEC71</i> (as)
CMU 025	GTA TAT CGA TAT CAG TAG TAT AGG G	Oligo zur Herstellung des $\Delta sec71$
CMU 026	CGA GAA GGT GTT GAA GGC CGC	Sequenz-Oligo für <i>SEC71</i>
CMU 029	ACA TGA GCT CCT AGG ATC CGA CAA ATA CGT CTG GTT GG	Oligo zur Herstellung von <i>SEC72</i> $\Delta$ TPR (as)
CMU 030	GGG GAT CCG AAA CTG CAA GAA ATA TGG C	Oligo zur Herstellung von <i>SEC72</i> $\Delta$ TPR (s)
CMU 054	GGT AAG GGG CGC AAA GC	PCR von genomischem <i>SBH2</i> (s)
CMU 055	GGA CGC GGA GCA CCA CC	PCR von genomischem <i>SBH2</i> (as)
CMU 056	CGC GGA TCC ATG GAA CAA AAG CTC ATT TCT GAA GAG G	3-myc tag (s)
CMU 057	CCG GAA TTC AGA TCT ATT AAG GTC CTC CTC GGA TAT TA	3-myc tag (as)
CMU 058	GAG AGA TCT GAG TTC AAT GAA ACA AAA TTC TCC AAC	PCR BglII- <i>SEC71</i> (s)
CMU 059	GGG GTA CCG GCA CTA ATT GAC TAA	PCR BglII- <i>SEC71</i> (as)
Inv-for	GGA AGA TCT ATG ATG CTT TTG CAA GCT TTC C	PCR von <i>SUC2</i> für pYPGE2-Ura
Inv-rev	GCC GAA TTC CTA TTT TAC TTC CCT TAC TTG G	PCR von <i>SUC2</i> für pYPGE2-Ura
SBH1-ANTI	CGG AAT TCG TTT TGT CAA ATA GGG TGG	PCR von <i>SBH1</i> für pRS414 GAL anti
SBH1-SENSE	AAA CTG CAG CCA TAA TGT CAA GCC CAA CTC C	PCR von <i>SBH1</i> für pRS414 GAL anti
P450-Cm1 (s)	CG GGA TCC ATG GCT ATA GAA CAA ATT ATT G	PCR des Membranankers von <i>P450</i> aus <i>Candida maltosa</i>
P450-Cm1 (as)	CG GAA TTC CTT TCA ACT TAT ATT CGT AAA ATT TAT TTC	PCR des Membranankers von <i>P450</i> aus <i>Candida maltosa</i>
SEC 71 (80-206)	CG GAA TTC TTA TGA GTG AAA ATG AAA AAA TTC	PCR des cytosolischen Teils von <i>SEC71</i> , Pos. 80-206aa
SEC 71 (120-206)	CG GAA TTC TTT ATA AAA ATG GCT CTA TTG GGG	PCR des cytosolischen Teils von <i>SEC71</i> , Pos. 120-206aa
SEC 71 (160-206)	CG GAA TTC TTC AAT TGT TCG TTA TGG TTT G	PCR des cytosolischen Teils von <i>SEC71</i> , Pos. 160-206aa

## 2.1.4 Verwendete Antikörper

Antigen	Antigene Sequenz	Herkunft	Verdünnung
Sbh1p	NH <sub>2</sub> - CPTPPGGQRTLQKRK-CONH <sub>2</sub>	E. Hartmann	1 : 50.000
Sbh2p	NH <sub>2</sub> -CKEKQAKQTP-CONH <sub>2</sub>	E. Hartmann	1 : 1.000
Sec61p	cys-LVPGFSDLM-COOH	E. Hartmann	1 : 5.000
Sec72p	Rekombinantes Protein	Diese Arbeit	1 : 1.000
Sec62p	CNKKKAINEKAEQN-COOH	E. Hartmann	1 : 20.000
CPY	Rekombinantes Protein Monoklonaler Antikörper 10A5-B5	Mo Bi Tec A 6428	1 : 5.000
c-myc Epitop	c-myc menschlichen Ursprungs, 9E19 Myc-tag	Santa Cruz sc-789-G	1 : 5.000
α-Faktor	Rekombinantes Protein	K. Plath, Boston	1 : 5.000
Invertase	Rekombinantes Protein	L. Lehle, Regensburg	1 : 5.000
Anti Rabbit IgG	Zweiter Antikörper gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase	Amersham NA 934	1 : 5.000
Protein A POD	Zweiter Antikörper gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase gegen natives IgG	Sigma P-8561	1 : 5.000

## 2.1.5 Puffer und Lösungen

Membranpuffer:

50 mM HEPES, pH 7,5  
 130 mM KOAc  
 10 % Glycerin  
 2 mM DTT  
 1:1000 PI

SDS-Probenpuffer:

2 % SDS  
 10 % Glycerin  
 60 mM Tris-Base  
 50 mM DTT  
 0,02 % Bromphenolblau

Proteaseinhibitoren-Mix (PI):

10 mg/ml Leupeptin  
 5 mg/ml Chymostatin in DMSO  
 5 mg/ml Pepstatin in DMSO

Denaturierender Lysis-Puffer:

1 % SDS  
 50 mM Tris, pH 7,5  
 1 mM PMSF

Lysis-Puffer (Membranpräparation):

50 mM Tris, pH 7,5  
 10 mM EDTA  
 1 mM MgCl<sub>2</sub>  
 1:1000 PI

5x Homogenisierungspuffer:

250 mM HEPES, pH 7,5  
 50 % Glycerin  
 25 mM KOAc  
 5 mM Magnesiumacetat  
 5 mM EDTA  
 25 mM DTT  
 10 mM PMSF  
 1:200 PI

IP-Verdünnungspuffer:

1,1 % Triton X100  
 165 mM NaCl  
 50 mM Tris, pH 7,5  
 5,5 mM EDTA  
 1 mM PMSF  
 1:1000 PI

1,1x IP-Puffer (Puls-Markierung):

1,1 % Triton X100  
 165 mM NaCl  
 55 mM Tris, pH 7,5  
 5,5 mM EDTA  
 1 mM PMSF

Hochsalz-Digitonin-Puffer (HD):

1 % Digitonin  
 1,2 M KOAc  
 50 mM HEPES, pH 7,6  
 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol  
 15 % Glycerin

TEST-Puffer:

10 mM Tris, pH 8,0  
 1 mM EDTA  
 100 mM NaCl  
 1 % SDS  
 2 % Triton X100

Puffer G:

0,1 M Sorbitol  
 50 mM HEPES, pH 7,5  
 100 mM KOAc  
 2 mM EDTA  
 1 mM DTT  
 1:1000 PI

Prä-Sporulationsmedium (PSPO):

0,8 % Bacto-Yeast-Extract  
 0,3 % Bacto-Peptone  
 10 % Glucose

Sporulationsmedium (SPO):

1 % KOAc  
 0,1 % Bacto-Yeast-Extract  
 0,05 % Glucose

SED-Puffer:

1 M Sorbitol  
 25 mM EDTA  
 50 mM DTT

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden**

Molekularbiologische Methoden und genetische Experimente wurden wie in Sambrook et al. (1989) beschrieben durchgeführt. Plasmide wurden nach alkalischer Lyse unter Zuhilfenahme von Qiagen-DNA-Isolierungskits nach Anleitung des Herstellers präpariert. Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des QUIAquick-Isolationskits laut Beschreibung. Restriktionsenzyme, Ligasen, Alkalische Phosphatase, RNase und Polynukleotidkinase wurden von den Firmen New England Biolabs, Promega oder Boehringer Mannheim bezogen. PCR-DNA-Polymerasen (Taq-Polymerasen) stammten von den Firmen Perkin Elmer, Amersham oder Roche. Pfu-DNA-Polymerase wurde von Stratagene geliefert, die dNTPs von Pharmacia. Sequenzierungen erfolgten mit unterschiedlichen Systemen, vorwiegend mit dem "fmol-PCR-Sequenzierungskit" von Promega, später mit dem „Thermo Sequenase Fluoreszenzkit“ von Amersham. Bakterien wurden durch Elektroporation mit Plasmid-DNA transformiert.

### **2.2.2 Biochemische Methoden**

#### **2.2.2.1 *In vitro* Transkription und *in vitro* Translation**

Die *in vitro* Transkription erfolgte mit dem RiboMAX Large Scale RNA Kit von Promega nach Angaben des Herstellers. Die erhaltene mRNA wurde in kleinen Aliquots bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die *in vitro* Translation erfolgte im Reticulocytenlysats von Promega. Das Reticulocytenlysats wurde 10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 14.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert, um eventuell enthaltene Membranen zu sedimentieren. Ein 100  $\mu\text{l}$  Ansatz enthielt 70  $\mu\text{l}$  Reticulocytenlysats, 2  $\mu\text{l}$  Aminosäurenmix ohne Methionin, 5  $\mu\text{l}$   $^{35}\text{S}$ -Methionin (370 MBq/ml, Amersham SJ123) und mRNA entsprechend dem titrierten Optimum. Die Translation erfolgte bei  $30^{\circ}\text{C}$  für ca. 30 min und wurde durch Zugabe von 2  $\mu\text{l}$  50 mM Cycloheximid und Inkubation für 10 min auf Eis gestoppt. Zur Abtrennung der Ribosomen wurde 10 min bei 100.000 rpm im TL100.2 Rotor (Beckman) bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert.

Der Einbau von photoreaktiven Quervernetzern (TDBA-Lys, Trifluoromethyl-diazirino-benzoic-acid-lysin) während der Translation erfolgte durch Verwendung eines Aminosäuren-

mixes ohne Methionin und Lysin und Zugabe von 4 µl TDBA-Lys / 100 µl. Alle Reaktionsschritte erfolgten aufgrund der Photoreaktivität bei gedämpftem Licht.

#### **2.2.2.2 Protein-Quervernetzung unter Verwendung von photoreaktivem TDBA-Lys**

Wegen der Photoreaktivität des TDBA-Lys erfolgten alle Schritte bei gedämpftem Licht. Die *in vitro* Translation eines TDBA-Lys markierten Sec72p erfolgte wie unter 2.2.2.1 beschrieben. 5 eq Sec72p-freie Membranen wurden in 10 µl Membranpuffer (siehe 2.1.5) resuspendiert. 9 µl Translationsansatz wurden hinzugefügt und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 90 µl Membranpuffer wurden die Membranen und das assoziierte Sec72p durch 20 min Zentrifugation bei 100.000 rpm und 4°C im TL100 sedimentiert. Das Pellet wurde je nach Fragestellung in 20 µl Membranpuffer bzw. Hefecytosol resuspendiert und der Ansatz halbiert. Die eine Hälfte wurde 15 min auf Eis mit einer UV-Lampe (Fa. Black Ray, Modell B100 AP) bestrahlt, während die andere Hälfte als Negativkontrolle diente. Zu beiden Ansätzen wurden jeweils 10 µl SDS-Probenpuffer (siehe 2.1.5) hinzugefügt. Die Proben wurden 10 min bei 65°C inkubiert und im SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde fixiert, getrocknet und mittels eines Phosphorimagers (Fuji BAS 1000) ausgewertet.

#### **2.2.2.3 Immunpräzipitation**

Je nach Aufgabenstellung wurden zur Solubilisierung unterschiedliche Detergenzien verwandt.

Bei einer Coimmunpräzipitation wurden die Membranen in Hochsalz-Digitonin-Puffer (HD) (siehe 2.1.5) 30 min auf Eis oder im Überkopfschüttler bei 6°C solubilisiert. Nach 20 min Zentrifugation bei 70.000 rpm und 4°C im TL100.4 Rotor (Beckman) wurde der Überstand abgenommen und mit einem gleichen Teil H<sub>2</sub>O verdünnt. Dem Ansatz wurden 1-5 µl Antikörper zugegeben und er wurde über Nacht im Überkopfschüttler bei 6 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 20 µl Protein A Sepharose, die zuvor in 0,5x HD-Puffer äquilibriert wurden, für mindestens 1 Stunde hinzugegeben und ebenfalls im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde 1 min bei 6.000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und aufgearbeitet. Die Protein A Sepharose wurde dreimal mit 0,5x HD-Puffer gewaschen und in 50 µl SDS-Probenpuffer (siehe 2.1.5) resuspendiert. Nach einer Inkubation für 20 min bei

65°C wurde der SDS-Probenpuffer über der Protein A Sepharose zur Analyse in eine SDS-PAGE eingesetzt.

Bei einer Immunpräzipitation wurden die Proteine 30 min in denaturierendem Lysis-Puffer (siehe 2.1.5) solubilisiert und nach der Zentrifugation mit 9 Volumen IP-Verdünnungspuffer (siehe 2.1.5) vermischt. Analog zum oben beschriebenen Ablauf erfolgten dann Zugabe von Antikörpern, Inkubation über Nacht, Bindung der Antikörper an äquilibrierte Protein A Sepharose und Probenaufarbeitung.

#### **2.2.2.4 Puls-Markierung von Transportproteinen**

Um die Akkumulation von CPY-Präkursoren in einem letalen Genotyp zu untersuchen, wurden Hefen, die das Plasmid pCU 098 oder pCU 099 trugen, sowie Kontrollstämme in Galaktose-haltigem Selektionsmedium angezogen und für 18 h in Glukose-haltiges Selektionsmedium überimpft. 6 OD<sub>600</sub> jedes Hefestamms wurden bei einer OD<sub>600</sub>  $\cong$  0,5 geerntet, in 350  $\mu$ l Glukose-haltigem Minimalmedium resuspendiert und 5 min bei 30°C leicht geschüttelt. Dann wurden jeweils 10  $\mu$ l Promix (<sup>35</sup>S-Methionin und <sup>35</sup>S-Cystein, 530 MBq/ml, Amersham SJQ0079) zugegeben und durchmischt. Nach exakt 4 min wurden 180  $\mu$ l kaltes 30 mM NaN<sub>3</sub> hinzugegeben, gut durchmischt und auf Eis gestellt. Die Zellen wurden 1 min bei 10.000 rpm und RT sedimentiert, das Pellet in 100  $\mu$ l denaturierendem Lysispuffer (siehe 2.1.5) aufgenommen und mit kleinen Glaskügelchen (425-600  $\mu$ m, Sigma) bis kurz unter die Wasseroberfläche vermenget. Die Zellen wurden durch starkes Schütteln für 2 min aufgebrochen und mit 900  $\mu$ l 1,1x IP-Puffer (siehe 2.1.5) verdünnt. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden die Ansätze für 10 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und wie im zweiten Teil von 3.2.2.2 beschrieben in eine IP eingesetzt. Die Detektion der radioaktiv markierten Proteine erfolgte nach der SDS-PAGE mittels Radiographie und einem Phosphorimager (Fuji BAS 1000).

#### **2.2.2.5 Bestimmung der Lokalisierung von Membranproteinen**

Zur Unterscheidung von peripheren und integralen Membranproteinen nutzt man ihr unterschiedliches Verhalten bei 0,5 M NaCl oder 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 11. Während sich periphere Membranproteine unter diesen Bedingungen ablösen, bleiben integrale Membranproteine verankert.

300 eq Membranen wurden in 400  $\mu$ l Puffer G (siehe 2.1.5) resuspendiert. Zu je 90  $\mu$ l der

Membranen wurden hinzugegeben: a) 10 µl H<sub>2</sub>O, b) 10 µl 5 M NaCl, c) 10 µl 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 11 und d) 10 µl 10% Triton X100. Die Ansätze wurden 30 min auf Eis inkubiert und gelegentlich durchmischt. Es folgte eine Zentrifugation bei 70.000 rpm und 4°C für 15 min im TL100-Rotor (Beckman). Die Überstände wurden abgenommen, mit 1/5 Vol. 100% Trichlor-Essigsäure (TCA) gefällt und in SDS-Probenpuffer (siehe 2.1.5) aufgenommen. Die Pellets wurden direkt in SDS-Probenpuffer resuspendiert. Alle Proben wurden 20 min bei 65°C denaturiert. Die Verteilung des Proteins zwischen Membranpellet und Überstand wurde im Western Blot analysiert.

### 2.2.3 Methoden zum Arbeiten mit *S. cerevisiae* (Bäckerhefe)

#### 2.2.3.1 Transformation von Hefen mit Plasmid-DNA

##### 2.2.3.1.1 Lithiumacetat-Methode

Die Plasmid-Transformation erfolgte in Anlehnung an Gietz et al. (1995).

Aus einer Übernachtskultur in YPD oder Selektionsmedium wurden 10 ml einer frischen Kultur angeimpft. Bei einer  $OD_{600} \leq 1,0$  wurden die Zellen sedimentiert, einmal mit dest. H<sub>2</sub>O gewaschen und in 1,5 ml 0,1 M LiOAc / 1x TE resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden sie in 0,2 ml 0,1 M LiOAc / 1x TE resuspendiert. Zu der Zellsuspension wurden bis zu 8 µl Plasmid-DNA und 10 µl Lachssperm-DNA (10mg/ml) gegeben und durchmischt. Es wurde 1 ml 40% PEG 6000 / 0,1 M LiOAc / 1x TE hinzugefügt, gemischt und 30 min bei 30°C inkubiert. Es folgte ein 15-minütiger Hitzeschock bei 42°C. Die Zellen wurden bei 1500 g sedimentiert, in 0,5 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert und 0,1 – 0,2 ml des Ansatzes auf Selektionsmedium ausplattiert.

Die beiden LiOAc-haltigen Lösungen wurden jeweils frisch aus Stammlösungen angesetzt.

##### 2.2.3.1.2 Hefetransformation mittels Elektroporation

500 ml einer YPD-Kultur wurden bei einer  $OD_{600}$  von 0,7 – 1,5 durch Zentrifugation bei 4000 g und 4°C für 5 min geerntet. Das Zellpellet wurde in 1 Vol. eiskaltem, sterilem H<sub>2</sub>O resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit ½ Vol. eiskaltem, sterilem H<sub>2</sub>O und mit 1/25 Vol. eiskaltem 1 M Sorbitol wiederholt. Das Pellet wurde in 1/1000 Vol. eiskaltem 1 M Sorbitol aufgenommen. Ein Aliquot von 40 µl wurde mit  $\leq 5\mu\text{l}$  Plasmid-DNA

vermischt und elektroporiert ( 0,2 cm Küvetten; 1,5 kV; 25  $\mu$ F; 200  $\Omega$  ). Zu dem Ansatz wurde 1 ml kaltes 1 M Sorbitol gegeben, gemischt und auf Selektionsmedium ausplattiert.

### 2.2.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen

1,5 ml einer Hefe-Übernachtskultur wurden zentrifugiert und das Zellpellet in 200  $\mu$ l TEST-Puffer (siehe 2.1.5) resuspendiert. Es wurden 200  $\mu$ l Phenol/Chloroform und kleine Glaskügelchen (425-600  $\mu$ m, Sigma) hinzugegeben. Nach 2 min Mischen und anschließender Zentrifugation wurde die obere, wässrige Phase zwei weitere Male mit Phenol/Chloroform extrahiert und restliches Phenol durch zweimalige Extraktion mit Chloroform entfernt. 2-4  $\mu$ l des Plasmid-Extrakts wurden dialysiert (Filter von Millipore, VSWP 025 00) und in eine *E.coli*-Elektroporation eingesetzt.

### 2.2.3.3 Kreuzung, Sporulation und Tetradenanalyse

Die Kreuzung zweier haploider Stämme mit verschiedenen Paarungstypen geschah durch Mischen von Aliquoten dieser Stämme (z.B. jeweils 5  $\mu$ l einer Flüssigkultur) auf einer Vollmedium-Agarplatte und Inkubation bei 30°C für 6-8 h. Es wurden Stämme mit unterschiedlichen Selektionsmarkern gewählt, so daß durch anschließendes Ausstreichen auf Selektionsplatten diploide Klone identifiziert werden konnten.

Die diploiden Hefen wurden für 6-8 h bei 30°C in Prä-Sporulationsmedium (siehe 2.1.5) inkubiert (> 34°C keine Sporulation). Anschließend wurden die Zellen bei 5000 rpm für 2 min zentrifugiert, einmal in Sporulationsmedium (SPO, siehe 2.1.5) gewaschen und in 1 ml SPO-Medium resuspendiert. Die Sporulation erfolgte bei 30°C für etwa 2 Tage im Inkubationsschüttler (längere Inkubation führt zu einem größeren Anteil keimungsunfähiger Sporen). Die Sporulationsrate wurde im Mikroskop überprüft. Optimal ist eine Sporulationsrate von 80-90 %. Die sporulierten Zellen wurden zentrifugiert und in 1 ml SED-Puffer (siehe 2.1.5) aufgenommen. Bei 4°C waren die Sporen für mehrere Tage haltbar.

Für die Tetradenanalyse wurden die sporulierten Zellen protoplastiert. 200  $\mu$ l sporulierte Hefezellen wurden mit 10  $\mu$ l 1 M DTT und 20  $\mu$ l Novozym (10 mg/ml) vermischt und für etwa 20 min (gegebenenfalls auch länger) bei RT inkubiert. Ein Aliquot wurde auf einer YPD-Platte zur Tetradenanalyse ausgestrichen und die vier Sporen von einzelnen Tetraden



wurden mit Hilfe eines Mikromanipulators (MSM, Fa. Singer) segregiert und nach einem definierten Schema an exakt definierten Punkten auf der YPD-Platte abgelegt. Die Analyse der Tetraden erfolgte anhand des Phänotyps bzw. der entsprechenden Selektionsmarker.

#### **2.2.3.4 Durchführung eines genetischen Screens zur Identifizierung synthetisch letaler Mutanten**

Die Durchführung eines genetischen Screens zur Identifizierung synthetisch letaler Mutanten erfolgte in Anlehnung an J. E. Kranz und C. Holm (1990).

Ziel des Screens ist die Identifizierung von bisher unbekannten Interaktionspartnern eines gemeinsamen Funktionsweges. Grundlage dafür ist die Annahme, daß sich Mutationen in zwei Proteinen, die am selben Prozeß beteiligt sind, in ihrer Wirkung additiv auswirken – und im Extremfall letal sind. Wohingegen dies für zwei Mutationen in unabhängigen Prozessen nicht der Fall ist.

Der Screen besteht aus zwei Teilen, der Mutagenisierung zur Herstellung Plasmid-abhängiger Klone und der Komplementierung der erhaltenen Mutanten mit einer genomischen Bank zur Identifizierung der beschädigten Gene. Für die detaillierten Grundlagen dieses Screens siehe J. E. Kranz und C. Holm (1990).

Eine Übernachtskultur des zu mutierenden Stamms (YUC 16 + pCU 085) wurde in frischem Minimalmedium verdünnt und bei 30°C bis zu einer  $OD_{600} = 0,6-1,0$  inkubiert. 10  $OD_{600}$  wurden zentrifugiert, einmal mit  $H_2O$  gewaschen und anschließend in 1 ml  $H_2O$  resuspendiert. Das Resuspendieren der Zellen wurde durch 1 min Beschallen im Ultraschallbad unterstützt. Die Zellsuspension wurde in eine Petrischale gegeben und 150 s auf dem UV-Tisch mit  $\lambda = 312$  nm und 90 W bestrahlt. Die Überlebensrate der Hefe betrug ca. 15%. Alle weiteren Schritte erfolgten im Dunkeln, um den Photoreparaturmechanismus der Zellen nicht zu aktivieren. Von einer 1:1000 Verdünnung der mutierten Zellen wurden je 200 µl auf einer Petrischale ( $\varnothing = 150$  mm) mit Selektionsmedium (SD-His, Trp, Ura) ausplattiert und bei 30°C mehrere Tage inkubiert. Die Ausprägung der auf der Anwesenheit von ADE3 (Teil des pCU 085) beruhenden roten Färbung der Zellen brauchte 5-7 Tage. 150.000 unabhängige Kolonien wurden gesichtet und solche Kolonien, die keine weißen Sektoren zeigten, wurden zur Kontrolle vereinzelt. Klone, die auch nach einer dritten Vereinzelung immer noch ausschließlich rot waren, wurden nach Anzucht in YPD über Nacht parallel auf SD-His, Trp, Ura und 5'FOA SD-His, Trp ausgestrichen. 5'FOA dient der Gegenselektion von Uracil-prototrophen Hefen. Gesucht wurden Klone, die auf das URA-Plasmid mit den Genen für

*ADE3* und *SEC72* (pCU 085) angewiesen waren und somit nicht auf 5'FOA wuchsen. Alle Klone, die diese Bedingungen erfüllten wurden mit zwei weiteren Kontrollplasmiden (pJF 14 und pCU 088) transformiert, um zu bestätigen, daß es der Sequenzabschnitt für *SEC72* ist, der das Mutationsplasmid (pCU 085) erforderlich macht. Das Plasmid pJF14 entspricht pCU 085 ohne *SEC72*. Das Plasmid pCU 088 ist identisch zu pCU 085 mit der Ausnahme daß es nicht das Gen für *ADE3* besitzt. Mutanten, die ausschließlich auf das komplementierende *SEC72* im pCU 085 angewiesen sind, können nach der Transformation mit dem Plasmid pCU 088 das Mutationsplasmid pCU 085 verlieren, nach der Transformation mit pJF 14 dagegen nicht. Von 150.000 untersuchten unabhängigen Klonen erfüllten zwei Klone (Klon 49-1 und Klon 190-83) all diese Kriterien.

### **2.2.3.5 Präparation von Hefemembranen**

#### **2.2.3.5.1 Präparation von Hefemembranen aus kleinen Kulturen**

Aus einer Übernachtskultur in YPD oder Selektionsmedium wurden 20 ml einer frischen Kultur angeimpft. Bei einer  $OD_{600} \leq 1,0$  wurden 10  $OD_{600}$  der Zellen bei 1100 g und RT sedimentiert, einmal mit Lysispuffer (siehe 3.1.5) gewaschen, in 200  $\mu$ l Lysispuffer resuspendiert und mit Glaskügelchen (425-600  $\mu$ m, Sigma) bis zur Flüssigkeitsoberfläche gefüllt. Der Ansatz wurde fünfmal 30 s geschüttelt und zwischendurch 30 s auf Eis abgekühlt. Das Lysat wurde abgenommen, und die Glaskügelchen wurden zweimal mit 500  $\mu$ l Lysispuffer nachgewaschen. Die vereinten Überstände wurden niedertourig bei 400 g und 4°C 10 min in der Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand dann zur Pelletierung der Membranen 10 min bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde entweder in Membranpuffer (siehe 2.1.5.) oder zur direkten Analyse in SDS-Probenpuffer (siehe 2.1.5) aufgenommen. Für eine anschließende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) hat sich eine Konzentration der Membranen von 1  $OD_{600}$  / 10  $\mu$ l bewährt.

#### **2.2.3.5.2 Präparation von Hefemembranen aus großen Kulturen**

Es gibt verschiedene Aufschlußmethoden, die sich vor allem durch die technischen Möglichkeiten des Labors ergeben. Im folgenden werden drei Methoden beschrieben, die in dieser Arbeit Anwendung fanden. Der Aufschluß mittels einer Glasmühle eignet sich besonders für große Präparationen, während der Vorteil des Zerreibens in flüssigem Stickstoff besonders in der Anwendung auf mittlere Mengen beruht.

**2.2.3.5.2.1 Aufschluß mittels einer Glasmühle**

Die Hefezellen wurden bei einer  $OD_{600} \approx 1,0$  durch Zentrifugation bei 3000 rpm und 4°C für 15 min geerntet und mit 1x Homogenisierungspuffer (siehe 2.1.5) gewaschen. Die Masse des Pellets wurde bestimmt und in dem doppelten Volumen seines Gewichtes 2,5x Homogenisierungspuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in einen speziellen Schüttelzylinder (Braun Melsungen) überführt und mit einer der Masse des Pellets entsprechenden Masse Glaskugeln versetzt. Der Aufschluß erfolgte durch viermaliges Schütteln für je 30 s unter CO<sub>2</sub>-Kühlung und zwischenzeitliches Kühlen auf Eis.

Das Lysat wurde abgenommen, und die Glaskugeln wurden zweimal mit 1x Homogenisierungspuffer nachgespült. In drei aufeinanderfolgenden Zentrifugationen wurden zuerst Zellreste und Zellkerne (3000 rpm, 10 min bei 4°C im Falcon-tube), dann Mitochondrien, größere Zellfragmente und andere Organellen (9000 rpm im Sorvall SS34 für 10 min bei 4°C) und abschließend die Membranen sedimentiert (75.000 rpm im TL100.3-Rotor (Beckman) für 20 min bei 4°C). Das Membranpellet wurde in einem angemessenen Volumen Membranpuffer (siehe 2.1.5) mit einem Homogenisator resuspendiert.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Vermessen einer Verdünnung in 2% SDS nach folgender Formel:  $OD_{280} * \text{Verdünnungsfaktor} / 50 = x \text{ eq}/\mu\text{l}$ .

**2.2.3.5.2.2 Aufschluß durch Zymolyase-Behandlung**

Die geernteten Zellen wurden in 0,5x YPD / 1,1 M Sorbitol (ca. 2 ml/g Feuchtwicht) resuspendiert. Es folgten Zugabe von 100%-igem  $\beta$ -Mercaptoethanol (0,7  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ) und Zymolyase 100T (0,5 mg/g Zellen) und vorsichtiges Schwenken bei 30°C. Der Grad der Sphäroplastierung wurde durch den Anteil der „Ghosts“ in 1% SDS unter dem Mikroskop bestimmt. Zellen, die in Minimalmedium angezogen wurden, bilden eine stabilere Zellwand aus und lassen sich daher schlechter sphäroplastieren als Zellen, die in Vollmedium gewachsen sind. Die Sphäroplasten wurden bei 2800 rpm für 10 min sedimentiert, mit 0,5x YPD / 1,1 M Sorbitol gewaschen und in 1-2 ml Membranpuffer (siehe 2.5.1) resuspendiert. Durch mehrmalige Behandlung mit einem Braun Homogenisator wurden sie aufgeschlossen. Das erhaltene Lysat wurde wie unter 2.2.3.5.2.1 beschrieben in mehreren Schritten zentrifugiert und anschließend vermessen. Die Zellen des niedertourigen Pellets wurden 3-4 Mal aufgeschlossen und die Überstände vereinigt.

---

**2.2.3.5.2.3 Aufschluß durch Zerreiben in flüssigem Stickstoff**

Die geernteten Zellen wurden in einem kleinen Volumen Membranpuffer (siehe 2.1.5) resuspendiert und in einen Mörser mit flüssigem N<sub>2</sub> getropft. Die gefrorenen Kügelchen wurden zu einem feinen Pulver zerrieben, das in ein Zentrifugengefäß überführt und durch Zugabe von wenig Membranpuffer aufgetaut wurde. Nach der niedertourigen Zentrifugation (wie in 2.2.3.5.2.1 beschrieben) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet 2-3 weitere Male aufgeschlossen. Die vereinten Überstände wurden wie in 2.2.3.5.2.1 beschrieben weiterbehandelt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Analyse der Funktion von SEC71

#### 3.1.1 Coletalität von SEC71 in Kombination mit $\Delta sbh1$ .

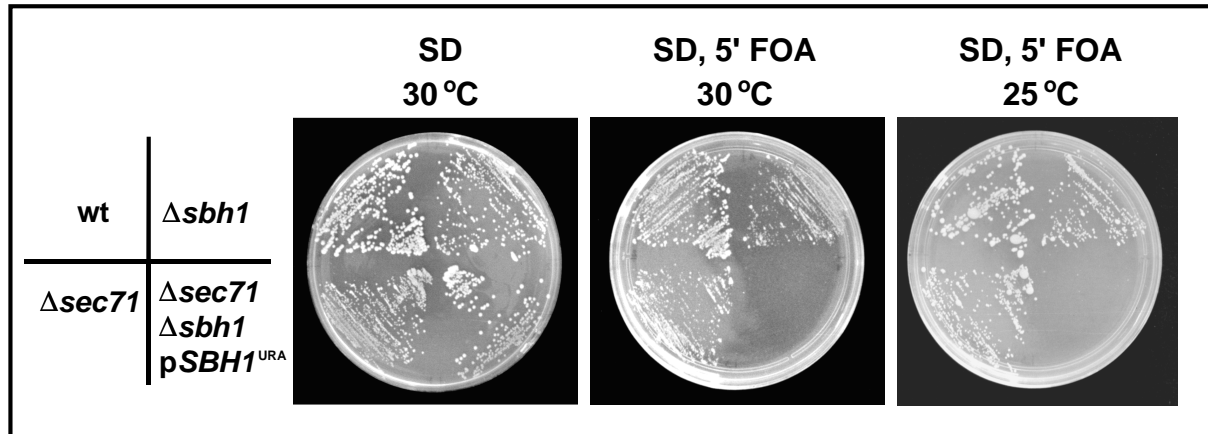
Zu Beginn der funktionellen Analyse von SEC71 und SEC72 in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* war bekannt, daß die Deletionsmutanten der beiden Gene unter normalen Wachstumsbedingungen weder einzeln noch in Kombination letal sind. Ein  $\Delta sec71$ -Stamm ist bei 37°C letal (Kurihara und Silver, 1993; Feldheim et al., 1993).

Um die Funktion von Sec71p in Kombination mit anderen nichtessentiellen Komponenten des SEC-Komplexes erforschen zu können, wurde nach synthetisch letalen Phänotypen gesucht. Dazu wurde die Deletionsmutante von SEC71 mit Deletionen für SBH1 bzw. SBH2 kombiniert, beides sind nichtessentielle Komponenten der Translokationskomplexe. Eine Kombination von  $\Delta sec71$  und  $\Delta sec72$  erübrigte sich, da aus der Literatur bekannt war, daß Sec72p in einem  $\Delta sec71$ -Hintergrund stark destabilisiert ist und mit einer Halbwertszeit von 12 min degradiert wird (Feldheim und Schekman, 1994).

Der  $\Delta sec71$ -Stamm ist kreuzungsdefizient, deswegen wurden die diploiden Doppeldeletionsstämme  $\Delta sec71/SEC71, \Delta sbh1/SBH1$  (YUC 1) bzw.  $\Delta sec71/SEC71, \Delta sbh2/SBH2$  (YUC 3) durch aufeinanderfolgende Transformation des diploiden YTX69 mit PCR-Fragmenten zur Einführung entsprechender Nullmutanten hergestellt. Durch Tetradenanalyse der beiden diploiden Stämme YUC 1 und YUC 3 wurden die 4 Sporen segregiert. Im Falle des  $\Delta sec71/\Delta sbh2$  fanden sich Sporen, die beide Selektionsmarker besaßen und in denen die Abwesenheit von Sec71p und Sbh2p im Western Blot nachgewiesen wurde (YUC 14). Die Doppeldeletionsmutante  $\Delta sec71/\Delta sbh2$  ist somit lebensfähig.

Im Falle des Stamms YUC 1 ( $\Delta sec71/SEC71, \Delta sbh1/SBH1$ ) fanden sich keine haploiden Doppelnullmutanten. Um die Letalität der Doppelmutante zu bestätigen, wurde YUC 1 mit einem Plasmid, das für SBH1 codiert und einem URA-Selektionsmarker besitzt, transformiert und anschließend einer Tetradenanalyse unterzogen. Dabei entstehende Sporen, die nachweislich alle drei Selektionsmarker trugen (YUC 2 + pSBH1<sup>URA</sup>), wurden auf einer 5'FOA-haltigen Selektionsplatte ausgestrichen, um gegen das SBH1-codierende URA-Plasmid zu selektieren. 5'FOA (5'-Fluoroovatic Acid) wird im Uracil-Stoffwechselweg zu einem Zellgift umgewandelt. Nur Uracil-prototrophe Hefen, die in diesem Stoffwechselweg deletiert sind,

können in Gegenwart von 5'FOA wachsen. Die Gegenselektion ergab, daß der Hefestamm  $\Delta sec71/\Delta sbh1$  auf das komplementierende Plasmid angewiesen und die Doppeldeletionsmutante  $\Delta sec71/\Delta sbh1$  somit nicht lebensfähig ist. Sie wächst auch nicht bei 25°C (Abb. 3).

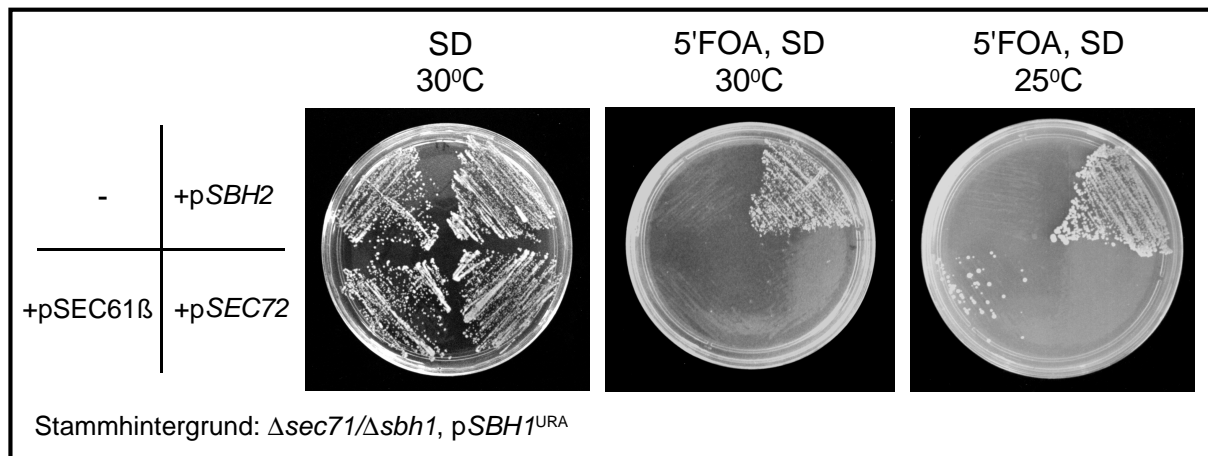


**Abb. 3:** Genetische Interaktion von *SEC71* und *SBH1*. Hefestämme wie angegeben, wurden über Nacht in YPD angezogen, ausgestrichen und bei den angegebenen Temperaturen 2-3 Tage inkubiert.

Als nächstes stellte sich die Frage, ob die Doppelnullmutante durch andere Komponenten des Translokationskomplexes außer *SEC71* oder *SBH1* komplementiert werden kann. Dazu wurde der Stamm YUC 2 +  $pSBH1^{URA}$  ( $\Delta sec71/\Delta sbh1$ ,  $pSBH1^{URA}$ ) mit Plasmiden für *S.c. SBH2*, Säuger SEC61 $\beta$  und *S.c. SEC72* transformiert. Es handelte sich dabei um multicopy-Plasmide; die Gene waren unter Kontrolle des starken PGK-Promotors (Phosphoglyceratkinase). Bei dem anschließenden Ausstreichen auf Selektionsplatten + 5'FOA kann die Doppelmutante das *SBH1*-codierende URA-Plasmid nur verlieren und somit wachsen, wenn eines der anderen Gene die letalen Deletionen komplementiert. Die erhöhte Expression von Sbh2p konnte den Phänotyp unter allen getesteten Bedingungen komplementieren, während das Sec61 $\beta$  aus Säugern dies nur bei 25°C tut. Überexprimiertes Sec72p ist unter keinen Umständen zu einer Komplementation fähig (Abb. 4).

Interessant ist die Tatsache, daß das endogen vorhandene Sbh2p nicht ausreicht, um die Doppeldeletionsmutante zu komplementieren. Da bekannt war, daß der Proteingehalt an Sbh2p deutlich abnimmt, wenn es im  $\Delta ssh1$ -Stamm seinen Bindungspartner verliert (Finke et al., 1996), stellte sich die Frage, ob das zusätzliche Deletieren des Gens für *SSH1* im  $\Delta sec71/\Delta sbh1$ -Stamm ausreichend Sbh2p freisetzen kann, um den letalen Effekt zu beheben. Dazu wurde in den  $\Delta sec71/\Delta sbh1$ ,  $pSBH1^{URA}$ -Stamm (YUC 2 +  $pSBH1^{URA}$ ) mittels Transformation die  $\Delta ssh1$ -Deletion eingeführt (YUC4). Die erhaltenen Transformanten wurden wie bereits beschrieben auf ihr Wachstum in Anwesenheit von 5'FOA getestet. Es

stellte sich heraus, daß das zusätzliche Deletieren von *SSH1* ebenfalls den tödlichen Phänotyp des  $\Delta sec71/\Delta sbh1$  beheben kann (Daten nicht gezeigt).

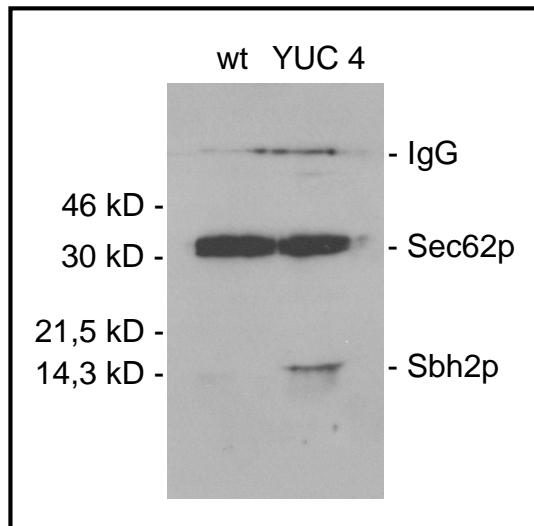


**Abb. 4:** Versuch zur Komplementation des Hefestamms  $\Delta sec71/\Delta sbh1$ . Hefezellen der  $\Delta sec71/\Delta sbh1$ -Doppelmutante, die ein *SBH1*-codierendes URA-Plasmid (pCU 051) enthielten, wurden mit 2 $\mu$ -Plasmiden für *SBH2* (pCU 049), Säuger SEC61 $\beta$  (Klon 7/11) oder *SEC72* (pCU 033) transformiert. Die Transformanten wurden über Nacht in YPD angezogen, auf SD-Platten mit bzw. ohne 5'FOA ausgestrichen und bei den angegebenen Temperaturen 2-4 Tage inkubiert.

Das Komplementieren der  $\Delta sec71/\Delta sbh1$ -Doppeldeletionsmutante durch einen erhöhten Gehalt an Sbh2p bzw. durch das zusätzliche Deletieren von *SSH1* deuten darauf hin, daß Sbh2p unter diesen Umständen in den SEC-Komplex integriert sein könnte und Sbh1p teilweise funktionell ersetzen kann. Im Wildtyp ist Sbh2p Bestandteil des Ssh1-Komplexes, ein Austausch von Sbh1p und Sbh2p in den unterschiedlichen Translokationskomplexen des Wildtyps ist nicht bekannt. Für die Doppelnulldummutante  $\Delta sbh1/\Delta ssh1$  konnte Kerstin Finke jedoch mittels Coimmunpräzipitation zeigen, daß Sbh2p in Assoziation mit Sec61p vorliegt.

Daraus ergab sich die Frage, ob eine Assoziation von Sbh2p mit dem SEC-Komplex verantwortlich ist für die Komplementation der  $\Delta sec71/\Delta sbh1$ -Doppeldeletionsmutante.

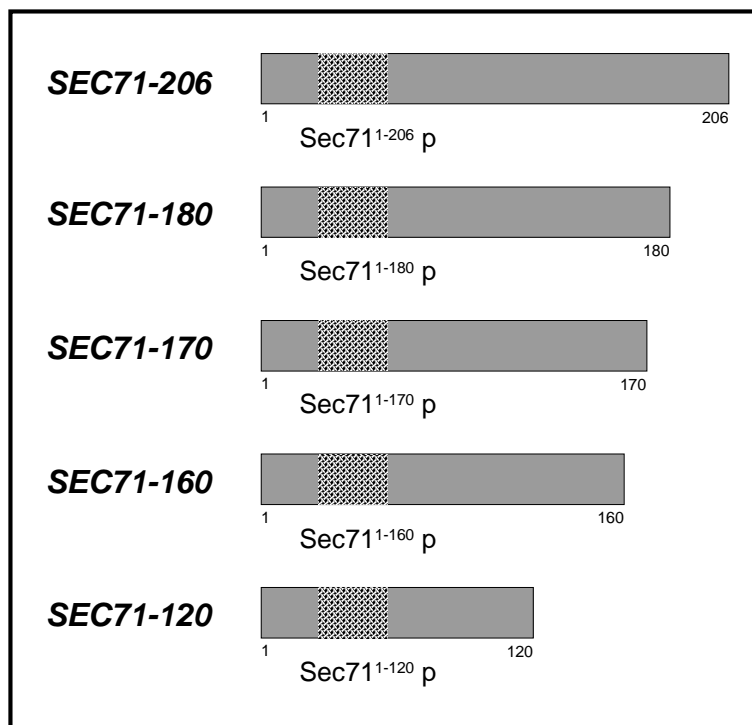
Um dies zu untersuchen, wurde eine Coimmunpräzipitation von solubilisierten SEC-Komplexen des Wildtyps (YTX 57) und YUC 4 ( $\Delta sec71/\Delta sbh1/\Delta ssh1$ ) mit Antikörpern gegen Sec62p durchgeführt. Durch Western Blot Analyse wurde die Assoziation von Sbh2p mit dem SEC-Komplex (Sec62-Präzipitat) in der dreifachen Deletionsmutanten nachgewiesen. Im Wildtyp wurde kein Sbh2p in Assoziation mit Sec62p gefunden (Abb. 5).



**Abb. 5:** Coimmunpräzipitation zur Analyse der Komplexumgebung von Sbh2p in Abwesenheit von Ssh1p. 300 eq Membranen des Wildtyps (YTX57) und des YUC 4 ( $\Delta sec71/\Delta sbh1/\Delta ssh1$ ) wurden in Digitonin solubilisiert, und das Solubilisat über Nacht mit Antikörper gegen Sec62p sowie mit ProteinG Sepharose inkubiert. Die an ProteinG Sepharose gebundenen Fraktionen wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit Antikörpern gegen Sec62p und gegen Sbh2p getestet.

### 3.1.2 Die N-terminalen 160 Aminosäuren des Sec71p sind *in vivo* in Abwesenheit von Sbh1p essentiell.

Um die Bedeutung der cytosolischen Domäne von Sec71p zu erforschen, wurden mittels PCR C-terminale Verkürzungen von Sec71p hergestellt und unter die Kontrolle des starken PGK-Promotors in Plasmide eingefügt (Abb. 6).



**Abb.6:** Schematische Darstellung der C-terminalen Verkürzungen von *SEC71*. Das Konstrukt SEC71-206 entspricht dem Wildtyp. Alle Zahlenangaben beziehen sich auf Aminosäuren. Die Transmembrandomäne zwischen Aminosäuren 28 und 51 ist gemustert dargestellt.

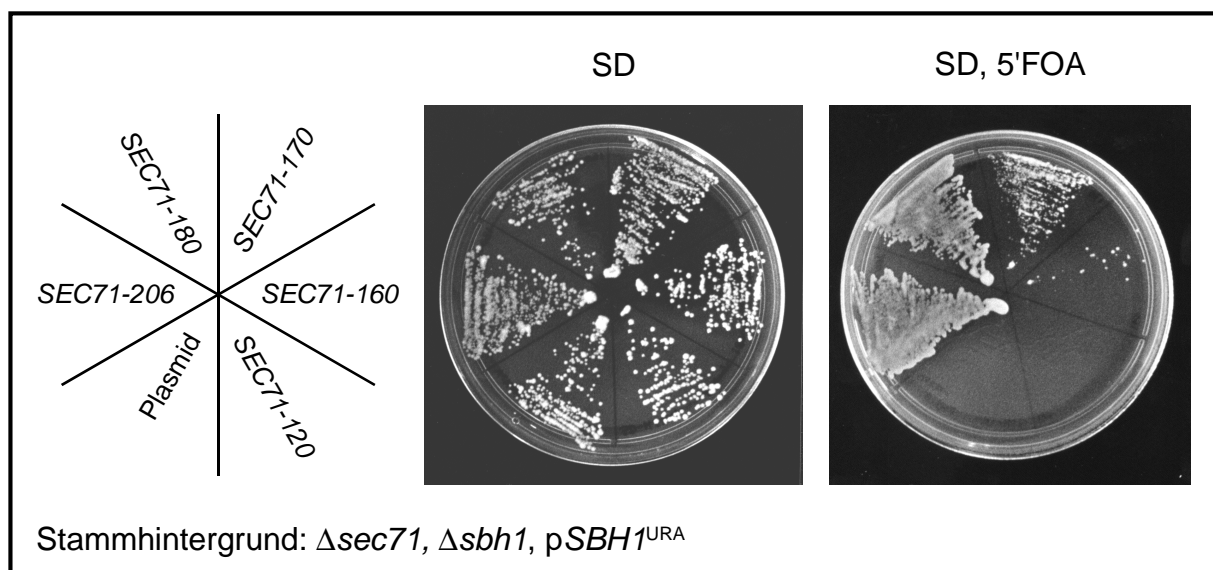
Als erstes wurde untersucht, inwieweit die einzelnen Verkürzungen in der Lage sind, für *SEC71* zu komplementieren. Dazu wurden die entsprechenden Plasmide in den Stamm



YUC 2 + pSBH1<sup>URA</sup> ( $\Delta sec71/\Delta sbh1$ , pSBH1<sup>URA</sup>) transformiert. Durch Ausstreichen der Transformanten auf 5'FOA-haltigen Selektionsplatten wurde bestimmt, ob die  $\Delta sec71/\Delta sbh1$ -Doppelmutante weiter auf pSBH1<sup>URA</sup> angewiesen ist, oder ob die entsprechende Sec71p-Verkürzung komplementiert.

Wie Abb. 7 zeigt, können SEC71-206 und SEC71-180 für normales Wachstum komplementieren, während SEC71-170 und SEC71-160 zwar komplementieren, dies aber mit einem deutlich verminderten Wachstum. SEC71-120 komplementiert nicht.

Das gleiche Ergebnis erhält man mit entsprechenden Transformanten des YUC 10-Stamms ( $\Delta sec71/\Delta sbh1/\Delta sbh2$ ), der durch ein Plasmid mit dem Gen für SBH2 unter Kontrolle des Methionin-Promotors komplementiert wird. Bei Zugabe von 4 mM Methionin zum Selektionsmedium erfolgt eine Repremierung des Met-Promotors und der Gehalt an Sbh2p sinkt auf Null. Die Hefen der Triple-Deletionsmutante können daher nur auf Methionin-haltigen Selektionsplatten wachsen, wenn die zusätzlich eingeführte Sec71p-Verkürzung die Funktion von Sec71p übernehmen kann. Auch in diesem System darf der C-Terminus nicht weiter als bis Pos. 160 aa verkürzt werden, um zu komplementieren (Daten nicht gezeigt).

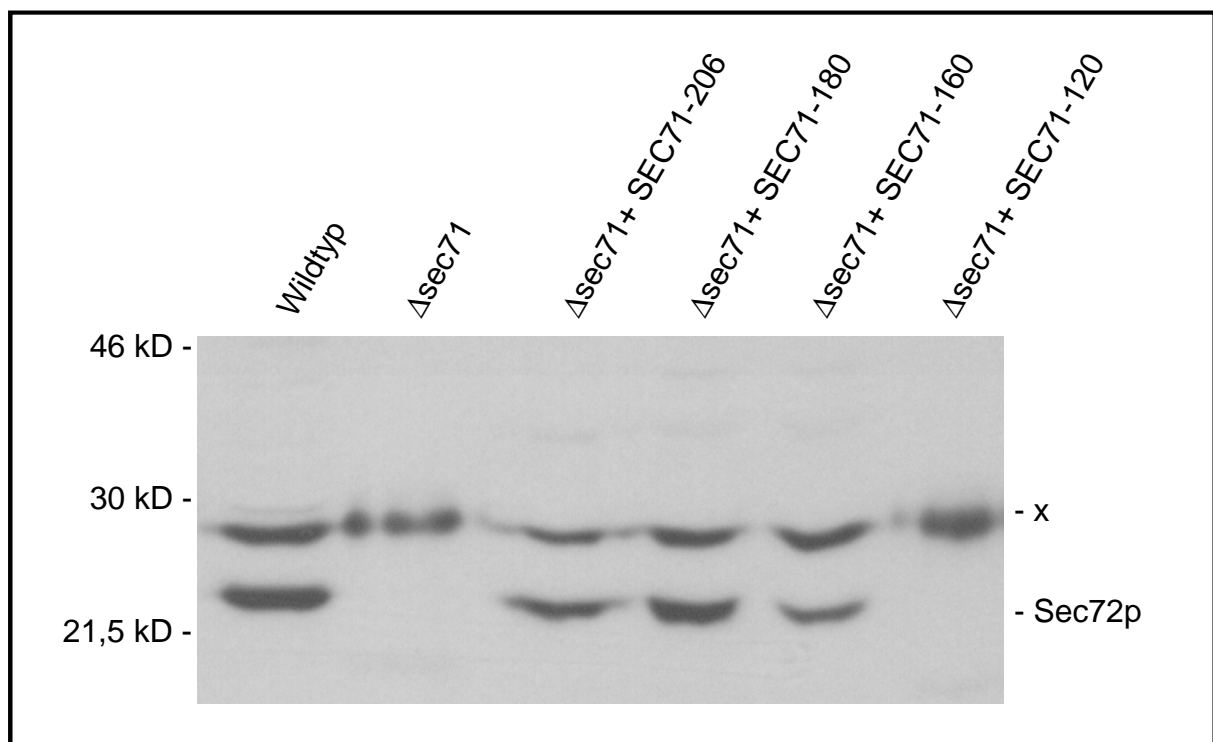


**Abb. 7:** Versuch zur Komplementation des Hefestamms  $\Delta sec71/\Delta sbh1$  mit C-terminalen Verkürzungen von SEC71. Zellen des Hefestamms  $\Delta sec71/\Delta sbh1$ , pSBH1<sup>URA</sup> wurden mit Plasmiden transformiert, die für das Wildtyp-Protein (SEC71-206), sowie C-terminale Verkürzungen von Sec71p codierten. Die Transformanten wurden über Nacht in YPD angezogen, auf Selektionsplatten mit bzw. ohne 5'FOA ausgestrichen und bei 30°C drei Tage inkubiert. Alle Positionsangaben sind Aminosäureangaben.

### 3.1.3 Der C-Terminus von Sec71p ist notwendig für die Bindung von Sec72p, sowohl in vivo als auch in vitro.

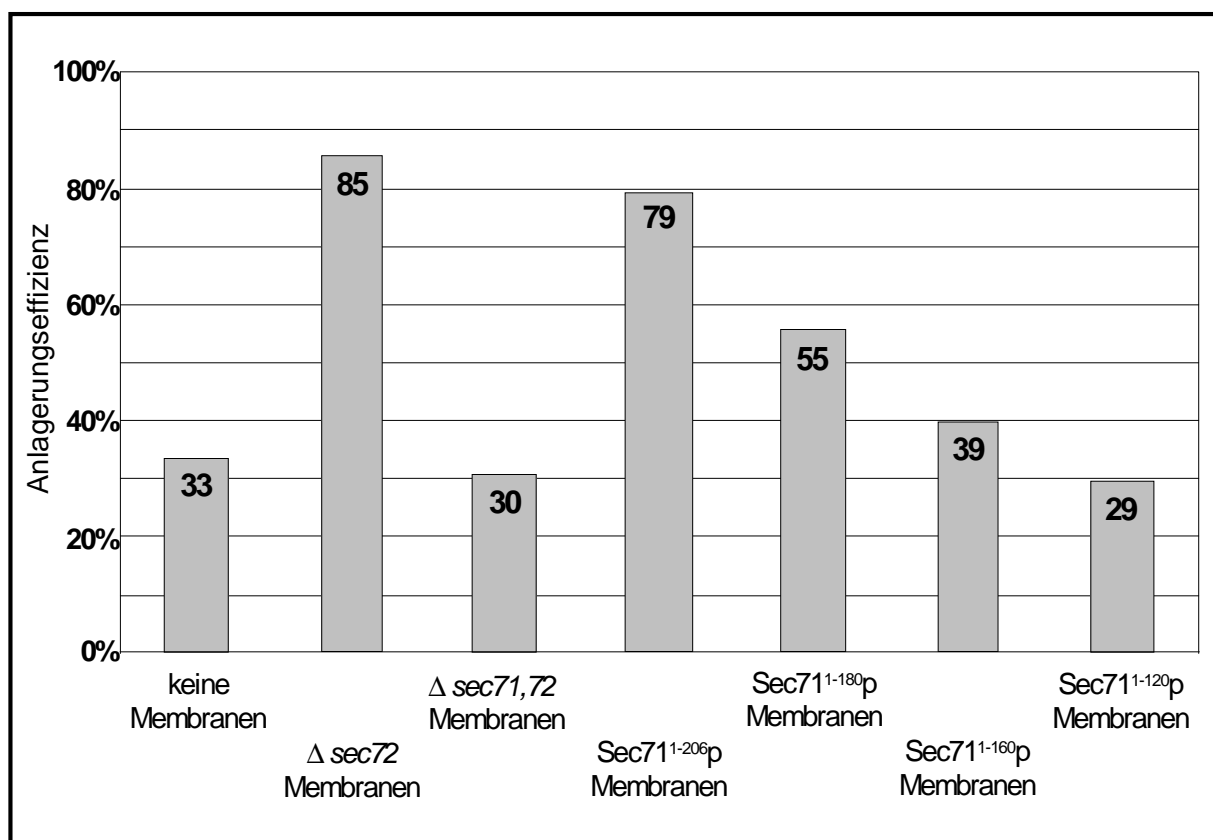
Wie bereits erwähnt, ist Sec71p für die stabile Anlagerung von Sec72p an die Membran notwendig. Interessant ist daher die Frage, ob es zwischen der Fähigkeit der verkürzten Sec71p-Formen einen  $\Delta sec71/sbh1$ -Phänotyp zu komplementieren und der Stabilisierung von Sec72p an der Membran einen kausalen Zusammenhang gibt. Dazu wurde ein  $\Delta sec71$ -Deletionsstamm (YUC 11) mit den Plasmiden für die verkürzten Sec71-Konstrukte transformiert. Von den erhaltenen Transformanten wurden Membranen präpariert, die im Western Blot auf die Anwesenheit von Sec72p getestet wurden. Abb. 8 ist zu entnehmen, daß eine Anlagerung von Sec72p nur an Sec71p-Varianten von mindestens 160 Aminosäuren Länge erfolgt. Somit korrelieren die Eigenschaften von Sec71p-Verkürzungen Sec72p anlagern zu können und den letalen  $\Delta sec71/\Delta sbh1$ -Phänotyp zu komplementieren.

Die Bindung von Sec72p an die verschiedenen Sec71p-Verkürzungen wurde außerdem auf ihre Hochsalz- bzw. Alkali-resistente Anlagerung getestet. Unterschiede in der Qualität der Anlagerung konnten dabei nicht festgestellt werden.



**Abb. 8:** Anlagerungsverhalten von Sec72p an C-terminale Verkürzungen von Sec71p. Transformanten des  $\Delta sec71$ -Stamms mit Plasmiden, die für Sec71p-Verkürzungen wie angegeben codierten, wurden in Selektionsmedium angezogen. Aus kleinen Kulturen wurden Membranen präpariert, je 2 OD<sub>600</sub> der Membranen im SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit Antikörpern gegen Sec72p getestet. Die kreuzreaktive Bande (-x) bestätigt das Auftragen gleicher Mengen.

Um die Anlagerung von Sec72p an Sec71p bzw. verkürzte Formen des Sec71p exakter quantifizieren zu können, wurde sie in einem *in vitro*-System untersucht. Dazu wurden Membranen aus Hefestämmen mit verschiedenen Sec71p-Varianten präpariert, Sec72p wurde *in vitro* translatiert und durch den Einbau von  $^{35}\text{S}$ -Methionin radioaktiv markiert. Anschließend wurden die verschiedenen Membranen mit dem Translationsansatz 20 min bei 30°C inkubiert und in einer hochtourigen Zentrifugation sedimentiert. Überstände und Pellets der einzelnen Ansätze wurden aufgearbeitet und durch SDS-PAGE und Radiographie auf die Verteilung von Sec72p zwischen Membran und Überstand hin analysiert. Abb. 9 zeigt die prozentuale Anlagerungseffizienz in Abhängigkeit der Sec71p-Verkürzung.



**Abb. 9:** Untersuchung zur *in vitro* Anlagerung von Sec72p an verschiedene Sec71p-Varianten. Jeweils 5 eq der angegebenen Membranen wurden mit frischem, *in vitro* synthetisiertem Sec72p 20 min bei 30°C inkubiert. Die Membranen wurden sedimentiert, gewaschen und in Probenpuffer aufgenommen. Die Proteine aus den Überständen wurden mit TCA gefällt und in gleichen Mengen Probenpuffer resuspendiert. Mittels SDS-PAGE und Radiographie wurde die Verteilung von Sec72p zwischen Membranpellet und Überstand und daraus die Anlagerungseffizienz *in vitro* bestimmt. Mehrere Experimente bestätigten die hier gezeigten Ergebnisse. Der relativ hohe Hintergrund von ca. 30% Sec72p, der sich auch ohne Sec71p und vor allem auch ohne Membranen im Pellet findet, ist vermutlich auf Aggregate zurückzuführen.

Aus diesem Experiment lassen sich mehrere Aussagen ableiten. Zum einen bestätigt es die Abhängigkeit der Sec72p-Anlagerung von Sec71p ( $\Delta$ sec71,72-Membranen versus  $\Delta$ sec72-Membranen). Zum anderen unterstreicht es die Bedeutung des C-Terminus von Sec71p für

diese Bindung und schließt die Notwendigkeit weiterer Hefe-spezifischer, cytosolischer Bindungsfaktoren aus. Die kontinuierliche Abnahme der Anlagerungseffizienz deckt sich mit den Wachstumsdefekten (Abb. 7), die im Komplementationsversuch von YUC 2 mit den unterschiedlichen Verkürzungen von Sec71p beobachtet wurden. Die *in vivo* erhaltenen Daten werden somit durch die *in vitro* Daten bestätigt.

Zusammen mit den Ergebnissen aus 4.1.2 beweisen diese Daten, daß in Abwesenheit von Sbh1p die Ausbildung eines postulierten Signalsequenz-Antennenkomplexes durch Sec62p, Sec71p und Sec72p eine bedeutende Funktion übernimmt, und daß der C-terminale Bereich von 160-206 aa des Sec71p nicht zuletzt durch die Rekrutierung von Sec72p dabei eine wichtige Rolle spielt.

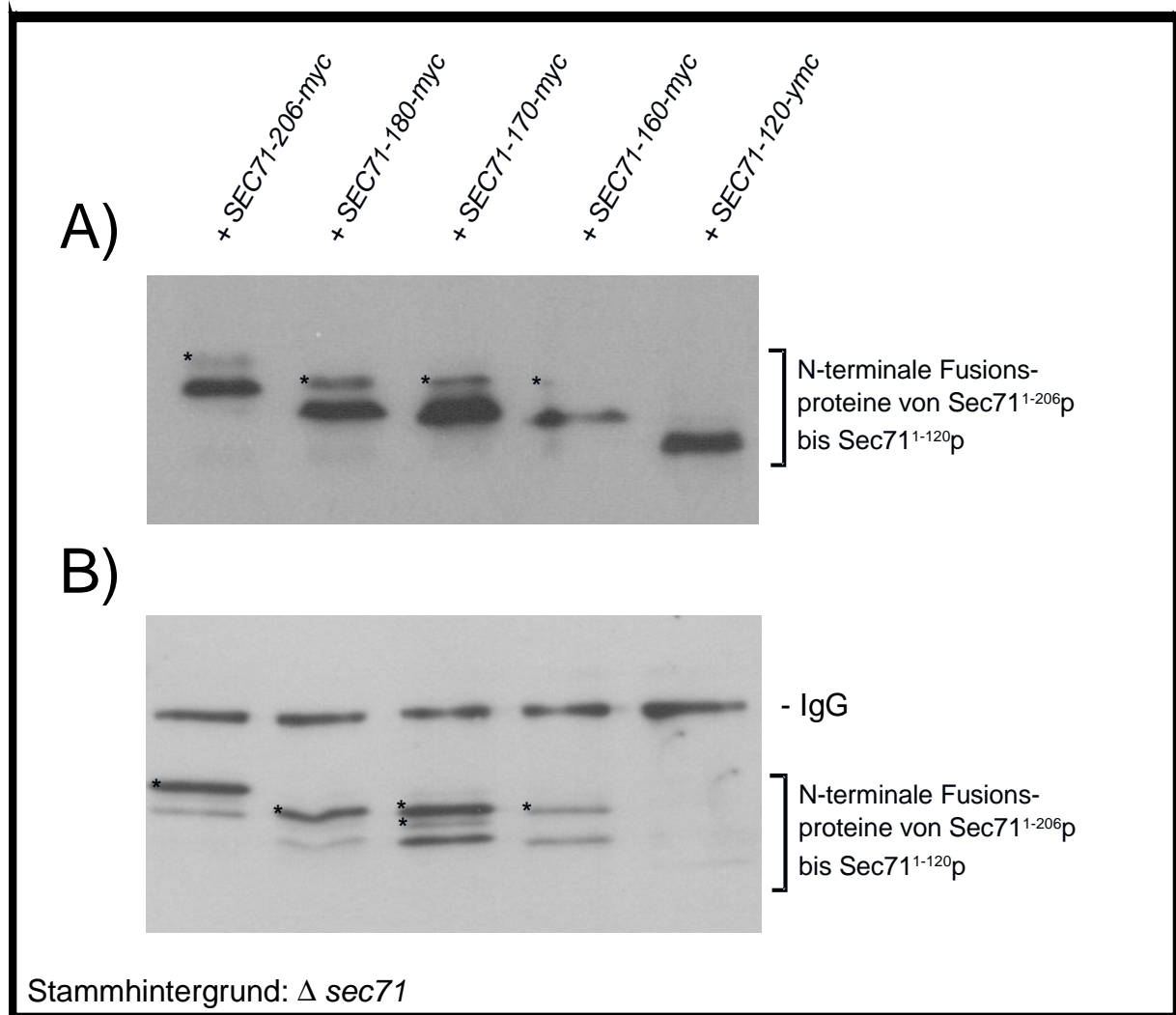
#### 3.1.4 Ein 160-mer von Sec71p ist erforderlich für die Assoziation mit dem SEC-Komplex

Um auszuschließen, daß der oben beschriebene Anlagerungsunterschied auf einen Abbau der Sec71p-Verkürzungen zurückzuführen ist, wurden N-terminale Fusionen der Sec71p-Verkürzungen mit einem dreifachen myc-tag kloniert und in einem  $\Delta sec71$ -Hintergrund (YUC 11) expremiert. Membranproteine der entsprechenden Hefestämme wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit Antikörpern gegen c-myc getestet. Abb. 10A zeigt, daß alle Verkürzungen von Sec71p stabil in die Membran integriert werden.

Die membranständige Expression ist kein ausreichender Beweis für die Integration der Sec71p-Verkürzungen in den SEC-Komplex, deshalb wurde mit den gleichen Membranen eine Coimmunpräzipitation unter 1% Digitonin mit Antikörpern gegen Sec62p durchgeführt. Unter den gewählten Bedingungen wird der SEC-Komplex als Ganzes solubilisiert und die Interaktion von Sec62p und Sec71p bleibt – zumindest im Wildtyp – erhalten.

Abb. 10B zeigt, daß unter den gewählten experimentellen Bedingungen die Assoziation der C-terminalen Sec71p-Verkürzungen mit Sec62p bis zum Sec71<sup>1-160</sup>p-myc erhalten bleibt. Die Menge an coimmunpräzipitiertem Sec71<sup>1-160</sup>p-myc ist im Vergleich zu den längeren Konstrukten jedoch geringer. Sec71<sup>1-120</sup>p-myc wird zwar membranständig expremiert, ist aber nicht wie die längeren Sec71p-Varianten mit Sec62p assoziiert. Damit ist bewiesen, daß der cytosolische C-Terminus von Sec71p nicht nur für die Sec72p-Anlagerung, sondern auch für die Assoziation mit dem SEC-Komplex wichtig ist.

Somit spiegeln sich auch hier die Ergebnisse der Komplementationsexperimente wieder:  $\text{Sec71}^{1-160}\text{p}$  ist minimal notwendig, um  $\text{Sec72p}$  zu binden, um einen  $\Delta\text{sec71}/\Delta\text{sbh1}$ -Stamm zu komplementieren und um mit dem SEC-Komplex zu assoziieren.



**Abb. 10:** Western Blot und Coimmunpräzipitationen der verkürzten Sec71p-myc Fusionsproteine. **A)** Der Hefestamm YUC 11 ( $\Delta\text{sec71}$ ) wurde mit Plasmiden für verkürzte Sec71p-Varianten mit N-terminalen 3x myc-Epitopen transformiert. 0,4 OD<sub>600</sub> entsprechender Membranpräparationen wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem Antikörper gegen c-myc im Western Blot getestet. Die N-terminale Fusion des 3x myc-Epitops führt vermutlich zu Beeinträchtigungen der Glykosylierung von Sec71p. Mit \* markierte Banden zeigen glykosylierte Formen der Sec71p-Varianten. **B)** Je 300 eq der jeweiligen Membranen wurden in eine Coimmunpräzipitation mit Antikörpern gegen Sec62p eingesetzt und im Western Blot auf die Anwesenheit der c-myc-markierten Sec71p-Verkürzungen getestet.

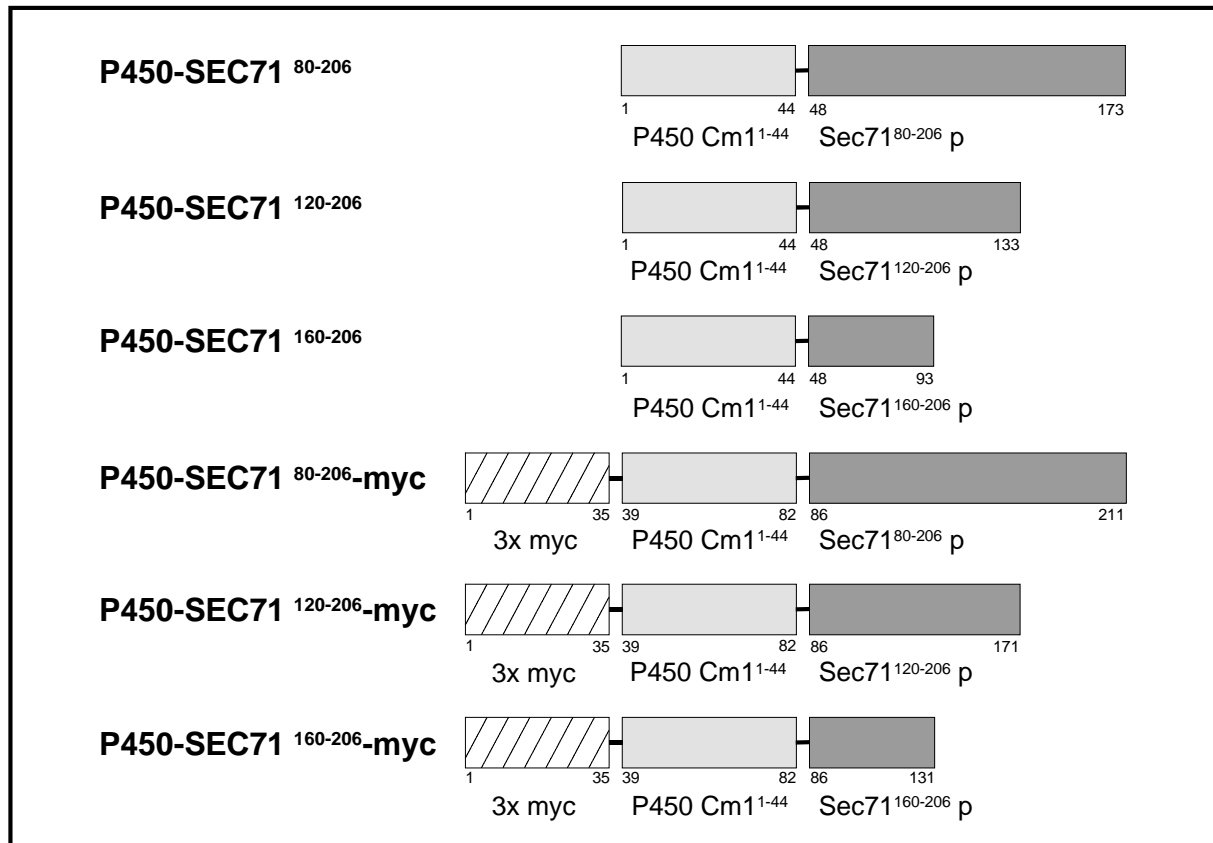
Bei näherer Betrachtung fällt auf, daß die glykosylierten Formen der Sec71p-Verkürzungen zwar prozentual den kleineren Anteil ausmachen, sich aber deutlich besser coimmunpräzipitieren lassen. Die zwei Glykosylierungen von Sec71p scheinen somit ein Indiz für die korrekte Konformation bzw. Orientierung der Fusionsproteine zu sein, die wiederum wichtig für die Assoziation der Sec71-Varianten mit dem SEC-Komplex ist.

### 3.1.5 Die 46 C-terminalen Aminosäuren von Sec71p sind ausreichend, um Sec72p zu binden.

Unklar ist, ob der cytosolische Teil des Sec71p für die Assoziation mit dem SEC-Komplex ausreicht, und inwiefern der Sec71-Membrananker ersetzt werden kann.

Um diesen Fragen nachzugehen, wurden Fusionsproteine des P450-Membranankers aus *Candida maltosa* (P450 Cm1<sup>1-44</sup>) und unterschiedlich langen cytosolischen Bereichen von Sec71p kloniert. Zu Detektionszwecken wurden die Konstrukte wieder N-terminal durch eine 3x-myc Domäne ergänzt (Abb. 11).

Menzel et al. (1996) haben für den P450 Cm1<sup>1-44</sup> Membrananker gezeigt, daß er ER-membranständig expremiert wird und die Orientierung der des Sec71-Membranankers entspricht (N-Terminus im Lumen, C-Terminus im Cytosol).

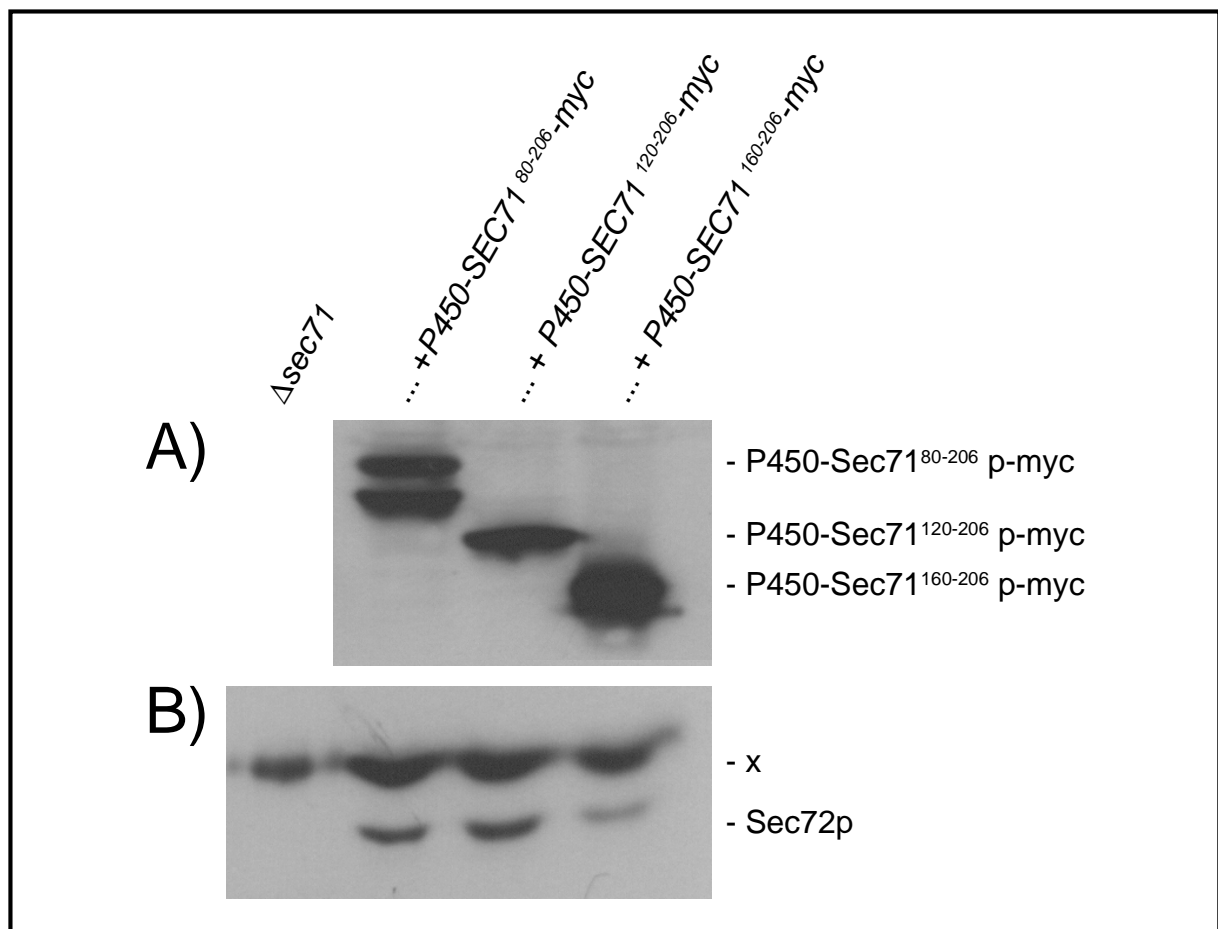


**Abb. 11:** Schematische Darstellung der Fusionsproteine von P450 Cm1-Membrananker aus *Candida maltosa* (P450 Cm1<sup>1-44</sup>) und verschiedenen cytosolischen Fragmenten von *S.c.* Sec71p. Jedes Konstrukt existiert sowohl als Fusion mit einem 3x myc-Epitop sowie auch ohne. Alle Positionsangaben beziehen sich auf Aminosäuren.

Zunächst wurde getestet, ob die P450-Sec71-Fusionsproteine expremiert und stabil in die Membran integriert werden. Dazu wurde der YUC 11-Hefestamm ( $\Delta sec71$ ) mit den P450-Sec71 Konstrukten, die das 3x myc-Epitop tragen, transformiert.

Membranen von positiven Klonen wurden im Western Blot mit Hilfe von Antikörpern gegen das c-myc-Epitop auf Signale der richtigen Größe getestet (Abb. 12A).

Desweiteren wurden Membranen der Transformanten von YUC 11 mit den drei P450-Sec71 Konstrukten ohne myc-Epitop auf die Anlagerung von Sec72p untersucht (Abb. 12B). Aus Abb. 12 ist zu ersehen, daß alle drei P450-Sec71p-Fusionsproteine sowohl membranständig expremiert werden, als auch Sec72p stabil an die Membran assoziieren können. Sec72p kann nur von der cytosolischen Seite aus angelagert werden, so daß zumindest ein Teil der Fusionsproteine die richtige Membranorientierung besitzen muß.



**Abb. 12:** Untersuchung zur Expression von P450-Sec71p-Fusionsproteinen und dem Anlagerungsverhalten von Sec72p an diese Fusionsproteine. **A)** Expressionsnachweis der P450-Sec71p-Fusionsproteine im Western Blot. Je 2 eq Membranen der angegebenen Hefestämme wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot auf das c-myc-Epitop getestet. An der Übergangsstelle zwischen c-myc-Epitop und P450-Membrananker ist eine neue Glykosylierungsstelle entstanden. Durch unvollständige Glykosylierung kommt es zum Auftreten der Doppelbanden bei P450-71<sup>80-206</sup>p-myc und P450-71<sup>160-206</sup>p-myc. **B)** *In vivo* Anlagerung von Sec72p an Membranen, die P450-Sec71p-Fusionsproteine enthalten. Membranen wie in A) sowie Membranen eines  $\Delta sec71$ -Stamms wurden im Western Blot mit Antikörpern gegen Sec72p getestet.

Vor allem aber grenzen diese Ergebnisse die Sec72-Bindungsdomäne von Sec71p ein. Die Assoziation von Sec72p mit P450-Sec71<sup>160-206</sup>p beweist, daß die letzten 46 Aminosäuren des

Sec71p ausreichen, um Sec72p zu binden. Allerdings ist die Menge an gebundenem Sec72p bei P450-71<sup>160-206</sup>p verglichen mit P450-71<sup>120-206</sup>p bzw. P450-71<sup>80-206</sup>p geringer. Dieser quantitative Unterschied zeigt, daß weitere Bereiche zwischen Pos. 120 und Pos. 160 von Sec71p an der Bindung von Sec72p beteiligt sind.

Bezieht man die *in vitro* Anlagerungsdaten (Abb. 9) mit in die Überlegungen ein, dann gibt es mindestens zwei Bindungsstellen für Sec72p, eine im Bereich 120-160 aa und eine weitere zwischen 160-206 aa. Beide Bereiche sind in der Lage sind, Sec72p selbständig zu binden, wenn auch mit eingeschränkter Effizienz. Inwiefern es sich dabei um unabhängige Bindungsdomänen handelt, oder ob durch die willkürlich gewählte Verkürzungsposition bei 160 aa eine zusammenhängende Bindungsdomäne geteilt worden ist, läßt sich aus diesen Ergebnissen nicht ableiten.

Für das P450-SEC71<sup>160-206</sup>-Konstrukt wurde außerdem nachgewiesen, daß die Assoziation mit diesem Bereich Hochsalz- und Alkali-resistent ist (Daten nicht gezeigt).

### 3.1.6 Der P450Cm1-Membrananker aus *Candida maltosa* ist nicht in der Lage den Sec71-Membrananker zu ersetzen.

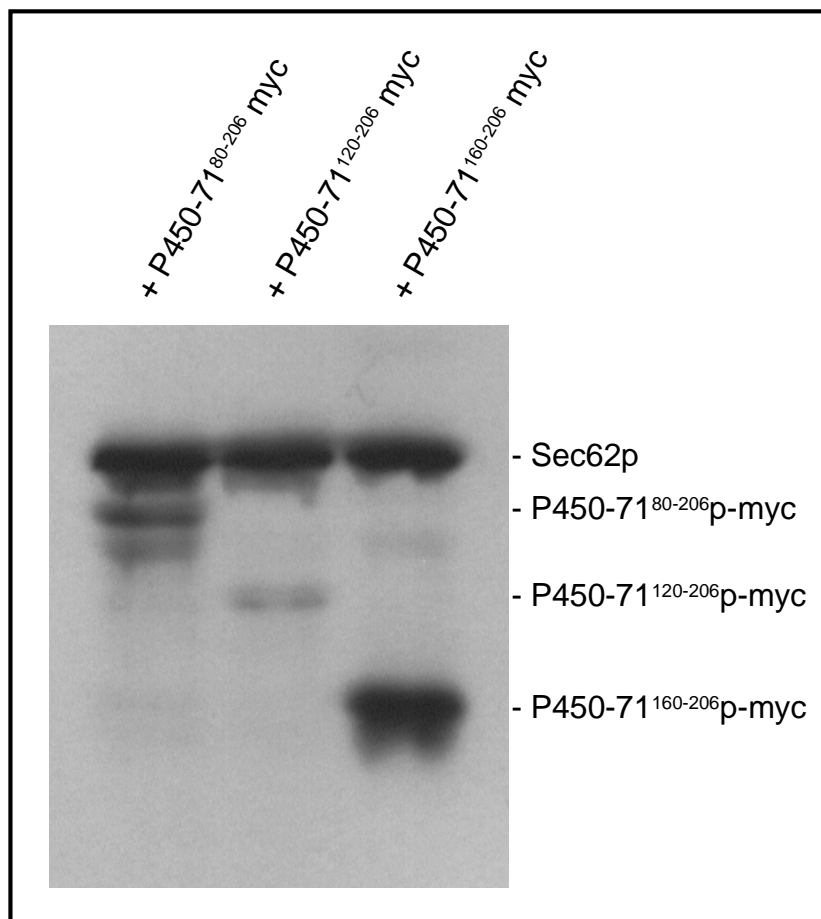
Aus den oben beschriebenen Ergebnissen ergab sich die Frage: ob der cytosolische Teil von Sec71p ausreicht, um mit dem Translokon zu assoziieren und ob die P450-Sec71p-myc Konstrukte mit Antikörpern gegen Sec62p coimmunpräzipitieren. Dazu wurden Membranen der entsprechenden YUC 11-Transformanten wie unter 3.2.2.2 beschrieben mit 1% Digitonin solubilisiert und in eine Coimmunpräzipitation mit Antikörpern gegen Sec62p eingesetzt (Abb. 13).

Wie Abb. 13 zu entnehmen ist, können P450-71<sup>80-206</sup>p-myc, P450-71<sup>120-206</sup>p-myc und auch P450-71<sup>160-206</sup>p-myc mit Antikörpern gegen Sec62p coimmunpräzipitiert werden. Somit reichen die letzten 46 Aminosäuren von Sec71p aus, um mit Sec62p zu interagieren. Vergleicht man die Effizienz der Immunpräzipitationen allerdings mit der einer Sec62 Coimmunpräzipitation gegen Sec71<sup>1-206</sup>p-myc im selben Stammhintergrund (Daten nicht gezeigt), so ist die Assoziation der P450-Sec71-myc Fusionsproteine mit Sec62p deutlich schwächer als die des wt-Sec71p. Der cytosolische Teil des Sec71p ist somit wichtig und ausreichend für die Assoziation mit Sec62p und somit mit dem SEC-Komplex. Wie schon bei den Coimmunpräzipitationen der C-terminalen Sec71p-Verkürzungen mit Antikörpern gegen Sec62p (Abb. 10) werden auch in diesem Experiment die glykosylierten Formen deutlich



besser coimmunpräzipitiert als die unglykosylierten Proteine. Besonders gut ist dies bei P450-71<sup>120-206</sup>p-myc zu sehen, das aus einem ungeklärten Grund kaum glykosyliert und daher kaum coimmunpräzipitiert wird. Es scheint sich daher zu bestätigen, daß die Glykosylierung von Sec71p einen wichtigen Hinweis auf die Assoziation mit dem SEC-Komplex liefert.

Der Einfluß des P450Cm1-Membranankers aus *Candida maltosa* läßt sich nur schwer abschätzen. Anzunehmen ist, daß er für die Verankerung der cytosolischen Fragmente von Sec71p an der ER-Membran notwendig ist. Ob er aber auch problemlos den Platz des Sec71-Membranankers im SEC-Komplex einnehmen kann, oder ob die hier beobachtete Assoziation nicht vor allem das Resultat einer rein statistischen Verteilung ist, bleibt offen. Vorstellbar ist auch, daß eine Assoziation der cytosolischen Fragmente von Sec71p auch ohne Membrananker möglich wäre. Die Anwesenheit des P450-Membranankers könnte deswegen auch eher störend für die Funktionalität des SEC-Komplexes sein.



**Abb. 13:**

Coimmunpräzipitation der P450-Sec71p-Fusionsproteine mit Antikörpern gegen Sec62p. Der Hefestamm YUC 11 ( $\Delta sec71$ ) wurde mit den Plasmiden pCU 109, pCU 110 und pCU 111 transformiert. Je 200 eq Membranen der Transformanten wurden in eine Coimmunpräzipitation mit Antikörpern gegen Sec62p eingesetzt. Die an Protein A Sepharose gebundenen Fraktionen wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit einem Antikörper gegen das c-myc Epitop auf die Anwesenheit von c-myc-markierten P450-Sec71-Fusionsproteinen getestet.

Komplementationsexperimente mit den P450-Sec71-myc Fusionsproteinen bzw. einem Sec71<sup>46-206</sup>p-Konstrukt ohne Membrananker sollten zeigen, ob die Fusionsproteine bzw. Sec71<sup>46-206</sup>p den letalen Genotyp  $\Delta sec71/\Delta sbh1$  komplementieren können. Dazu wurde der

Hefestamm YUC 2 + pGAL-SBH1 ( $\Delta sec71$ ,  $\Delta sbh1$ , pGAL-SBH1) mit Plasmiden für die drei P450-Sec71-Fusionskonstrukte und Sec71<sup>46-206</sup>p transformiert und auf SGal-haltigen Minimalplatten selektioniert. Transformanten wurden in SGal-haltigem Flüssigmedium über Nacht angezogen, dann parallel auf SGal- und SD-Platten ausgestrichen und je ein Paar der Platten bei 30°C, sowie bei 37°C und 23°C für mehrere Tage inkubiert.

Das Ergebnis war unerwartet. Während keines der P450-Sec71-myc Fusionsproteine YUC 2 komplementiert, ist Sec71<sup>46-206</sup>p bei allen getesteten Temperaturen in der Lage, für das wt-Sec71p zu komplementieren (Daten nicht gezeigt).

Diese Daten sprechen dafür, daß es die störende Wirkung des P450-Membranankers aus *C. maltosa* war, der eine Komplementation verhindert hat, und nicht das Fehlen des Sec71p-Membranankers, dessen Deletion sogar bei erhöhter Wachstumstemperatur toleriert werden kann. Außerdem zeigt dieses Experiment, daß Sec71p keinen Membrananker braucht, um seine Funktion (an der Membran) zu erfüllen. Wahrscheinlich ist eine Assoziation mit dem SEC-Komplex und eine Rekrutierung von Sec72p auch ohne Membrananker möglich.

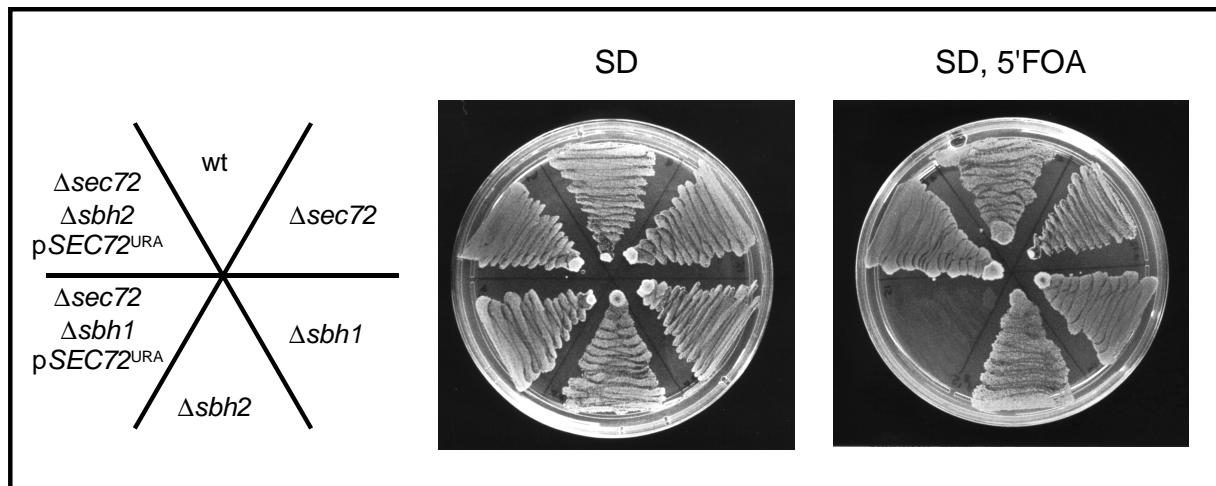
## 3.2 Untersuchungen zur Rolle von SEC72

### 3.2.1 Coletalität von SEC72 in Kombination mit $\Delta sbh1$

In den bisherigen Untersuchungen wurde der Beitrag verschiedener Domänen von Sec71p zur Assoziation von Sec71p mit dem SEC-Komplex, zur Komplementationsfähigkeit eines  $\Delta sec71/\Delta sbh1$ -Stamms und ihr Beitrag zur Sec72-Bindung untersucht. Dabei fällt auf, daß die Fähigkeit C-terminal verkürzter Sec71p-Varianten einen  $\Delta sec71/\Delta sbh1$ -Stamm zu komplementieren mit der Sec71p-vermittelten Bindung von Sec72p an die Membran einhergeht. Daraus ergab sich die Frage, ob das Ausbleiben der Assoziation von Sec72p mit dem SEC-Komplex im  $\Delta sec71/\Delta sbh1$ -Hintergrund entscheidend für den letalen Phänotyp ist. Dazu sollte zuerst eine  $\Delta sec72/\Delta sbh1$ -Doppelnulldumutante erzeugt werden. Die haploiden Stämme YUC 6 ( $\Delta sec72$ ) und YKF 8 ( $\Delta sbh1$ ) wurden gekreuzt, diploide Klone sporuliert und einer Tetradenanalyse unterzogen. In mehreren Anläufen gelang es nicht, lebensfähige Sporen, die beide Selektionsmarker trugen, zu finden. Daraufhin wurde der diploide Stamm aus YUC 6 x YKF 8 mit einem für SEC72 codierenden Plasmid, das einen URA3-Marker trägt (pCU 085), transformiert, sporuliert und erneut in Sporen segregiert. Es wurden vollständige Tetraden erhalten, mit einzelnen Sporen, die alle 3 Marker trugen.

Diese Sporen (YUC 15 + pCU 085) wurden zusammen mit einer Reihe von Kontrollen über Nacht in YPD angezogen, um ihnen die Möglichkeit zu geben, das URA-Plasmid zu verlieren. Anschließend wurden die Kulturen sowohl auf SD- als auch auf SD + 5'FOA-Platten ausgestrichen und für 2-3 Tage bei 30°C inkubiert.

Abb. 14 zeigt das Ergebnis. Die durch  $pSEC72^{URA}$  komplementierte Doppelmutante  $\Delta sec72/\Delta sbh1$  ist auf das URA-Plasmid angewiesen und kann somit nicht auf SD + 5'FOA wachsen. Die Doppeldeletion  $\Delta sec72/\Delta sbh1$  ist daher letal (siehe auch Kapitel 4.4). Das bedeutet, daß ein  $\Delta sbh1$  Stamm mit einer Sec71p-Verkürzung, die kein Sec72p binden kann, zwangsläufig letal sein muß, da  $\Delta sec72/\Delta sbh1$  letal ist. Und wie schon bei der  $\Delta sec71/\Delta sbh1$  Doppelnulldmutante, ist auch im Falle von  $\Delta sec72/\Delta sbh1$  der endogene Proteingehalt an Sbh2p nicht in der Lage zu komplementieren.



**Abb. 14:** Genetische Interaktion von *SEC72* und *SBH1*. Hefestämme wie im Schema links angegeben wurden über Nacht in Vollmedium angezogen, auf SD- bzw. SD + 5'FOA-Platten ausgestrichen und für 2-3 Tage bei 30°C inkubiert.

### 3.2.2 Eine C-terminale TPR-Domäne des Sec72p ist essentiell für seine Funktion.

Sec72p ist ein 193 Aminosäure langes Protein, das nahe dem C-Terminus eine Domäne enthält, die eine Ähnlichkeit zu „Tetratricopeptide repeat Domänen“ (TPR-Domänen) aufweist (Abb. 15). TPR-Domänen sind als Protein-Interaktionsdomänen beschrieben. In der Regel kommt die Konsensussequenz aus 34 Aminosäuren zwischen drei und zwölf Mal in einem Protein vor (Für einen Überblick siehe Goebel und Yanagida, 1991). Proteine mit TPR-Domänen sind beteiligt an Mitose, Transkription und auch am Proteinimport in

Mitochondrien und Peroxisomen. *S.c.*Tom70p als Teil des mitochondrialen Translokationskomplexes ist ein Protein mit 7 TPRs (Woelford, 1989) und *S.c.*Pas10p interagiert mit der peroxisomalen Targetingsequenz und ist ebenfalls ein Protein mit mehreren TPR Domänen (Brocard et al., 1994). Außerdem zeigten Radanyi et al. (1994), daß das Immunophilin FKBP59-HBI mit Hsp90p durch seine TPR-Domänen interagiert. Aufgrund dieser Hinweise wurde die TPR-Domäne des Sec72p deletiert und das entstehende Sec72ΔTPRp auf seine Funktionalität getestet.

```

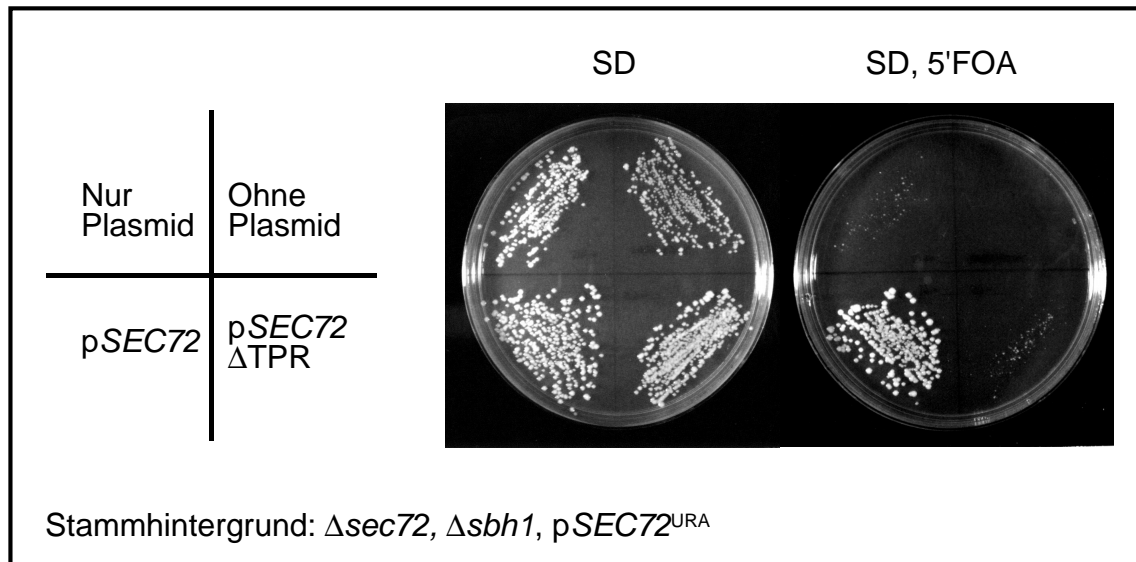
1   MVTLEYNANS KLITASDAVV ALSTETNIDQ INVLTTSLIG
41  ETNPNFTPQP NEALSKMIKG LFESGMKNLQ QKKLNEALKN
81  VSLAIEMAQR KRAPWEAF AI QLPELHFMLR SKIDLCLILG
121 KHLEALQDL D FLLGTGLIQP DVFVRKADCL LKL RQWEEAR
161 ATCERGLALA PEDMKLRALL IETARNLA EY NGE

```

**Abb. 15:** Aminosäuresequenz von *S.c.* SEC72. Die Tetratricopeptide Domäne (TPR-Domäne) ist grau unterlegt, die Lysine sind fett dargestellt.

Mittels PCR wurde ein entsprechendes low-copy Plasmid konstruiert, das *SEC72ΔTPR* hinter dem endogenen Promotor codiert (pCU 065). Dadurch sollte verhindert werden, daß eine erhöhte Proteinkonzentration an Sec72ΔTPRp einen möglichen Defekt supplemiert. Als Positivkontrolle diente ein identisches Plasmid mit dem intakten Gen (pCU 060).

Beide Plasmide wurden in den YUC 15 Hefestamm transformiert, der durch ein *pSEC72<sup>URA</sup>* komplementiert wurde. Als Negativkontrolle wurde das Ausgangsplasmid (pRS 415) mitgeführt. Transformanten aller drei Klone wurden über Nacht in YPD angezogen, um ihnen die Möglichkeit zu geben, daß komplementierende *pSEC72<sup>URA</sup>* zu verlieren. Dann wurden die Klone auf SD- bzw. SD + 5'FOA-Platten ausgestrichen und 2-3 Tage bei 30°C inkubiert (Abb. 16). *SEC72ΔTPR* kann YUC 15 nicht komplementieren, das intakte *SEC72* ist dazu in der Lage. Somit ist die TPR-Domäne des Sec72p von Bedeutung für seine Funktion. Aufgrund der entfernten Homologie zu anderen TPR-Domänen und der aufgeklärten Funktion dieser Proteine kann man daher die Hypothese aufstellen, daß die TPR Domäne von Sec72p für die Interaktion mit cytosolischen Proteinen wichtig ist.

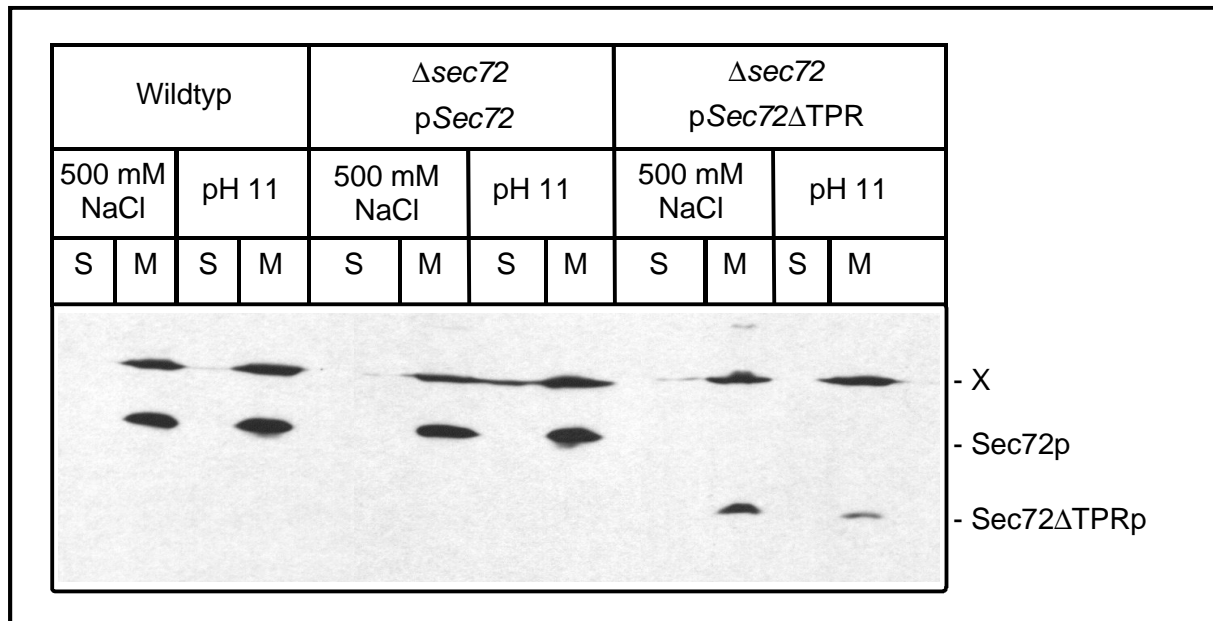


**Abb. 16:** Genetische Untersuchung zur Rolle der TPR-Domäne des Sec72p in Abwesenheit von *SBH1*. Transformanten von YUC15 + pSEC72<sup>URA</sup> ( $\Delta sec72/\Delta sbh1$  + pSEC72<sup>URA</sup>) mit pSEC72, mit pSEC72ΔTPR und mit pRS415 (Ausgangsvektor) wurden über Nacht in Vollmedium angezogen, auf SD- bzw. SD + 5'FOA-Platten ausgestrichen und 2-3 Tage bei 30°C inkubiert.

### 3.2.3 Die Deletion der TPR-Domäne ändert nicht die Lokalisierung von Sec72ΔTPRp.

Um auszuschließen, daß die Deletion der TPR-Domäne Sec72p instabilisiert hat, und es deswegen degradiert wurde, oder nicht mehr korrekt an die Membran assoziiert ist, wurde die Lokalisierung und die Art der Bindung von Sec72ΔTPRp im Vergleich zum wt-Protein untersucht. Wie bereits erwähnt, zeichnet sich die Assoziation von Sec72p an die Membran vor allem durch ihre Hochsalz-Resistenz und ihre Alkali-Beständigkeit aus. Sollte Sec72ΔTPRp sich ähnlich verhalten, so wäre davon auszugehen, daß es sich um eine korrekte Membranassoziation handelt.

Membranen von Transformanten von YUC 6 ( $\Delta sec72$ ) mit pCU 060 (pSEC72), bzw. mit pCU 065 (pSEC72ΔTPR) und Membranen von einem Wildtyp wurden entweder mit 500 mM NaCl oder mit 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH11 behandelt (3.2.2.4). Die Membranen wurden hochtourig sedimentiert und die Verteilung von Sec72p bzw. Sec72ΔTPRp zwischen Membranen und Überstand durch eine Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen Sec72p bestimmt (Abb. 17).



**Abb. 17:** Untersuchung zur Lokalisierung von Sec72ΔTPRp. Plasmide, die für *SEC72* bzw. *SEC72ΔTPR* kodieren wurden in den Stamm YUC 6 (Δ*sec72*) transformiert. Transformanten sowie ein Wildtyp als Kontrolle wurden in Minimalmedium angezogen und geerntet, Membranen wurden nach einem Standardprotokoll präpariert und entweder mit 500 mM NaCl oder mit 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 11 für 20 min inkubiert. Die Membranen wurden sedimentiert und die Verteilung von Sec72p bzw. Sec72ΔTPRp zwischen Membranen und Überstand durch eine Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen Sec72p durchgeführt.

Wie Abb. 17 zu entnehmen ist, assoziiert Sec72ΔTPRp unverändert Hochsalz-resistent und Alkali-beständig an Membranen. Der Funktionsverlust ist somit nicht auf eine Degradation oder falsche Lokalisierung zurückzuführen. Nach der Hochsalz- und Alkali-Resistenz zu urteilen, unterscheidet sich die Bindung von Sec72ΔTPRp nicht von der des wt-Proteins.

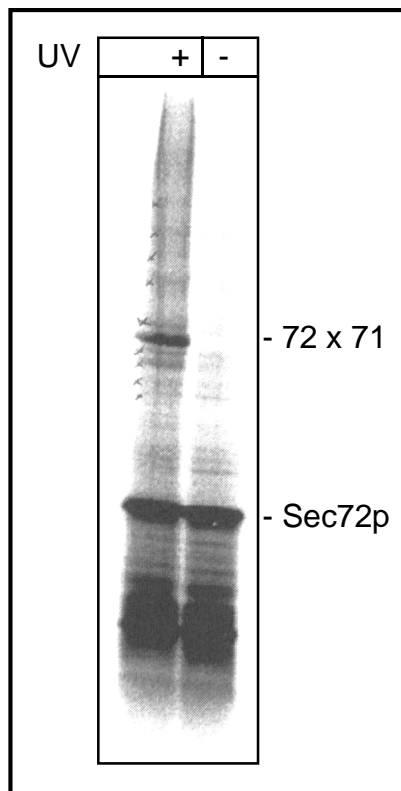
### 3.3 Quervernetzungsstudien zur Identifizierung von Interaktionspartnern von Sec72p.

Durch die cytosolische Ausrichtung von Sec72p und durch die Anwesenheit eines C-terminalen Bereichs mit Ähnlichkeit zu TPR-Domänen, dessen Fehlen nicht die Bindung an die Membran via Sec71p ändert, wohl aber die Fähigkeit eine  $\Delta sec72/\Delta sbh1$  Doppelnulmutante zu komplementieren, lag es nahe, nach eventuellen cytosolischen Interaktionspartnern von Sec72p zu suchen. Dazu wurde ein experimenteller Ansatz gewählt, der es erlaubt, ein Protein *in vitro* zu seiner Umgebung photochemisch quervernetzen (3.2.2.1).

Sec72p wurde *in vitro* translatiert und dabei durch den Einbau von  $^{35}\text{S}$ -Methionin radioaktiv markiert. Außerdem wurde teilweise anstelle der normalen Aminosäure Lysin ein

Lysin-Derivat in das Protein eingebaut (Positionen der Lysine im Sec72p siehe Abb. 15). Dieses Derivat (TDBA-Lys für Trifluoromethyl-diazirino-benzoic-acid-lysin) enthält eine photoreaktive Seitenkette, die bei Anregung mit UV-Licht kurzlebige Radikale bildet und in Nanosekunden mit benachbarten Molekülen (Proteine, Fette, H<sub>2</sub>O etc.) kovalente Bindungen eingeht.

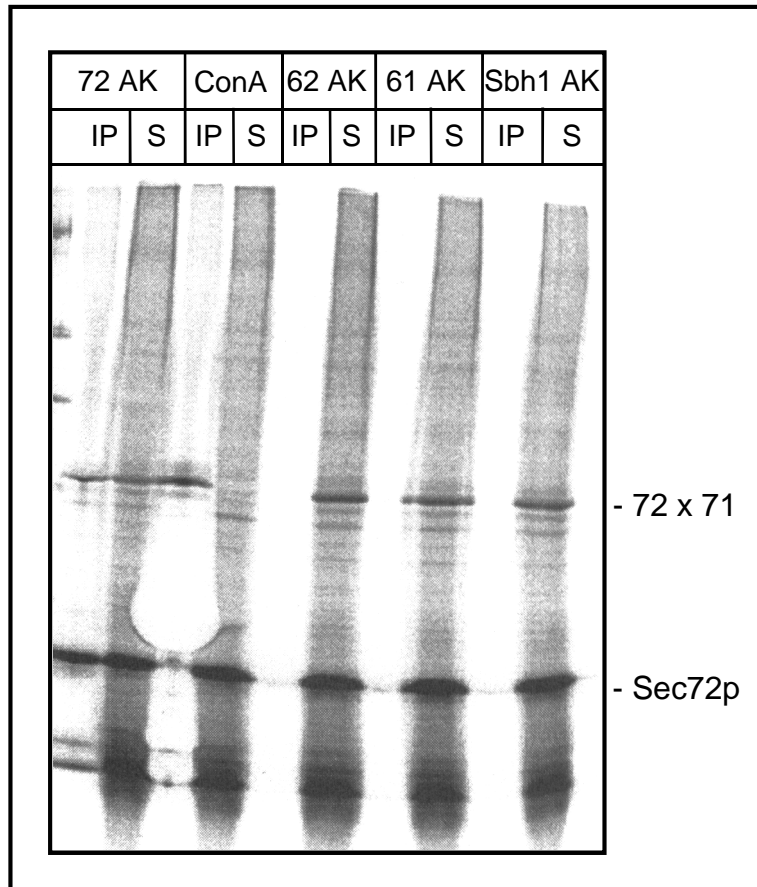
In einem ersten Experiment sollten benachbarte Membranproteine von Sec72p identifiziert werden. Das *in vitro* translatierte Sec72p wurde zu Sec72p-freien Membranen gegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Durch hochtourige Zentrifugation wurde membrangebundenes von nicht an Membranen gebundenes Sec72p getrennt. Die Membranen mit assoziiertem Sec72p wurden in einem kleinen Volumen Membranpuffer resuspendiert und der Ansatz halbiert. Während die eine Hälfte mit UV-Licht bestrahlt wurde, diente die andere Hälfte als Negativkontrolle. Beide Proben wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und radioaktive Proteinbanden durch Auflegen und Auswerten einer Phosphorimagerplatte sichtbar gemacht.



**Abb. 18:** Photoreaktive Quervernetzung von Sec72p zu seiner Membranumgebung. Sec72p wurde *in vitro* translatiert und dabei durch Einbau von <sup>35</sup>S-Methionin radioaktiv markiert. Das Lysin des Standard-Aminosäuremixes wurde bei der Translation durch photoreaktives TBDA-Lys ersetzt. Das *in vitro* translatierte Sec72p wurde mit Sec72p-freien Membranen 20 min auf Eis inkubiert. Durch hochtourige Zentrifugation wurden die Membranen und assoziiertes Sec72p sedimentiert. Das Membranpellet wurde in 20 µl Membranpuffer resuspendiert, der Ansatz halbiert und die eine Hälfte UV-bestrahlt. Beide Proben wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und die radioaktiven Proteinbanden mit Hilfe eines Phosphorimagers sichtbar gemacht.

In Abb. 18 ist neben der Sec72p-Grundbande eine zweite starke Bande zu sehen, deren Auftreten abhängig von der UV-Bestrahlung ist. Da anzunehmen war, daß es sich dabei um ein Protein des SEC-Komplexes handelt, wurde in einem weiteren Experiment der Photoquervernetzungsansatz aufgeteilt und in Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen Sec61p, Sec62p, Sbh1p bzw. Sec72p eingesetzt (Abb. 19). Für Sec71p war kein Antikörper verfügbar, deshalb wurde alternativ ConA Sepharose eingesetzt, die spezifisch Glykoproteine bindet (Sec71p ist das einzige glykosylierte Protein des SEC-Komplexes).

Das Quervernetzungsprodukt kann wie zu erwarten mit Antikörpern gegen Sec72p immunpräzipitiert werden, außerdem bindet es an ConA Sepharose, was ein Hinweis auf Sec71p ist. Um Sec71p eindeutig als Quervernetzungspartner zu identifizieren, wurde das Experiment mit Membranen wiederholt, die Sec71<sup>1-180</sup>p anstelle von Sec71<sup>1-206</sup>p (wt) enthielten. Dies führte zu einer geringen Verschiebung des Quervernetzungsprodukts zu kleinerem Molekulargewicht und identifizierte somit Sec71p eindeutig als Interaktionspartner von Sec72p (Daten nicht gezeigt). Festzuhalten ist auch die Tatsache, daß unter diesen Bedingungen weder Sbh1p noch Sec61p noch Sec62p sich photochemisch mit Sec72p verknüpfen lassen, und somit nicht in unmittelbarer Nähe zu sein scheinen.



**Abb. 19:** Immunpräzipitation des Sec72p-Quervernetzungsproduktes mit Antikörpern gegen verschiedene Proteine des SEC-Komplexes. Membranen mit *in vitro* translatiertem Sec72p (<sup>35</sup>S, TBDA-Lys) wurden UV-bestrahlt und anschließend in Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen Sec61p, Sec62p, Sec72p, Sbh1p sowie mit ConA Sepharose eingesetzt. Sowohl die an Protein A Sepharose bzw. ConA Sepharose gebundenen Fraktionen als auch die TCA-gefällten Überstände wurden im SDS-PAGE aufgetrennt. Die Verteilung des radioaktiven Quervernetzungsproduktes wurde durch Auflegen und Auswerten einer Phosphorimagerplatte analysiert.



Um eventuelle cytosolische Interaktionspartner von Sec72p zu identifizieren, wurde die UV-Quervernetzung von Membran-assoziiertem Sec72p in Folge-Experimenten in Gegenwart mehrerer Hefe-Cytosole durchgeführt. Dabei trat wiederum nur das 72 x 71 – Quervernetzungsprodukt auf, weitere Banden waren auch nicht bei Depletion des cytosolischen ATP vor der UV-Bestrahlung oder bei Verwendung des Cytosols eines  $\Delta srp54$ -Hefestamms (Hemmung des cotranslationalen Transportweges) zu beobachten.

Durch diesen Ansatz der photochemischen Quervernetzung konnte Sec71p als Interaktionspartner von Sec72p bestätigt werden; eine Wechselwirkung mit cytosolischen Proteinen wurde nicht gefunden.

### **3.4 Screen zur Identifizierung synthetisch letaler Mutanten in Kombination mit $\Delta sec72$ .**

Die nicht gefundene photochemische Quervernetzung von Sec72p zu cytosolischen Proteinen bedeutet nicht, daß es keine solche Interaktionen gibt. Eine mögliche Ursache für das Ausbleiben einer Quervernetzung könnte sein, daß kein TBDA-Lys sich in der unmittelbaren Nähe der Interaktionsgrenzfläche befindet. Andere Gründe könnten sein, daß die gesuchte Interaktion entweder sehr kurzlebig ist, oder die Affinität der Interaktionspartner *in vitro* sehr gering ist. Beides erschwert das Knüpfen einer kovalenten Bindung und wirkt sich negativ auf die Menge an Quervernetzungsprodukt aus.

Nachdem der biochemische Ansatz keine Interaktionspartner aufzeigen konnte, wurde daher mittels eines genetischen Ansatzes nach bisher unbekannten genetischen Interaktionspartnern von *SEC72* gesucht. Dazu wurde ein Screen zur Identifizierung synthetisch letaler Mutanten durchgeführt. Dieser Screen kann Proteine, die an einem gemeinsamen Stoffwechsel- oder Transportweg beteiligt sind, identifizieren.

Die Grundidee basiert darauf, daß Mutationen in zwei Genen eines gemeinsamen Stoffwechselweges additiv in ihrer Wirkung und im Extremfall synthetisch letal sind, während dies für zwei Mutationen in unabhängigen Stoffwechselwegen nicht zutrifft.

Im durchgeführten Screen gingen wir von einem  $\Delta sec72/\Delta sbh2$ , p*SEC72*-Stamm aus. Wir wählten einen  $\Delta sec72/\Delta sbh2$ -Stammhintergrund, um durch Beeinträchtigen des Ssh1-Komplexes größeren Streß auf die Zelle auszuüben.

150.000 unabhängige Klone wurden analysiert. Zwei Kandidaten (Klon 49-1 und Klon 190-83) waren auf ein komplementierendes p*SEC72* angewiesen. Membranen beider Klone wurden daraufhin im Western Blot auf die Anwesenheit aller möglichen Proteine des

Translokons getestet. Es zeigte sich, daß der Klon 49-1 kein Signal für Sbh1p zeigte. Bei der Komplementation des Klons 49-1 mit einer genomischen Hefe-Bank (ATCC 77162, bezogen von der American Type Culture Collection) wurden 13 Klone gefunden, die den Defekt beheben konnten. Die 13 Klone verteilten sich gleichmäßig auf *SEC72*, *SBH2* und *SBH1*. Während *SEC72* und *SBH2* durch die Ausgangssituation des Screens zu erwarten waren, bestätigte das Auffinden von *SBH1* den Befund aus dem Western Blot und die Coletalität von  $\Delta sec72$  mit  $\Delta sbh1$  wie in Kapitel 4.2 beschrieben. Sequenzieren der genomischen Kopie des *SBH1* aus dem Klon 49-1 ergab eine Deletion der Base 80 und daraus resultierend eine Verschiebung des Leserasters und einen Abbruch.

Der Klon 190-83 ließ sich nicht durch die LiOAc-Methode transformieren, sondern nur durch Elektroporation. In der Western Blot Analyse seiner Membranen waren alle bekannten Proteine des Translokationsapparates nachweisbar. Die Komplementation mit der genomischen Hefe-Bank ergab keine komplementierenden Klone (50.000 unabhängige Klone wurden gescreent, 1.000 unabhängige Klone sollen nach Angaben des Herstellers das Hefe-Genom repräsentieren). In weiteren Kontrollen wurde ausgeschlossen, daß es sich um eine dominante Mutation bzw. um eine Doppelmutation handelt. Unverständlich ist, daß selbst das Bank-Plasmid für *SEC72* – dessen Existenz in der Hefe-Bank mit der Komplementation von 49-1 und zusätzlich durch vier unabhängige PCRs nachgewiesen worden ist – nicht gefunden wurde.

Bei der verwendeten genomischen Bank (ATCC 77162) handelte es sich um eine low-copy Bank. Um auszuschließen, daß die Anzahl der Plasmide pro Zelle eine Rolle spielt, wurde der Klon 190-83 mit einer zweiten genomischen Bank auf einem high-copy Plasmid (ATCC 37323, bezogen von der American Type Culture Collection) durchgeführt. Die Analyse weiterer 50.000 Klone ergab auch bei Verwendung dieser zweiten Bank keinen positiven Klon.

Somit konnte durch den synthetisch letalen Screen kein weiterer genetischer Interaktionspartner von Sec72p aufgedeckt werden. Allerdings wurde auf einem unabhängigen Weg die synthetische Letalität von *SEC72* und *SBH1* bestätigt.

### **3.5 Ursachen für die synthetische Letalität von $\Delta sec71/\Delta sbh1$ und $\Delta sec72/\Delta sbh1$**

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die Ursache für die Letalität der Mehrfach-Mutanten näher untersucht. Für die Deletionsmutanten  $\Delta sec71$  bzw.  $\Delta sec72$  sind Transportdefekte

publiziert worden (Feldheim et al., 1993, 1994; Kurihara und Silver, 1993; Fang und Green, 1994), entsprechende Defekte sollten bei den Doppeldeletionsmutanten daher stärker auftreten als bei den Einzelmутanten.

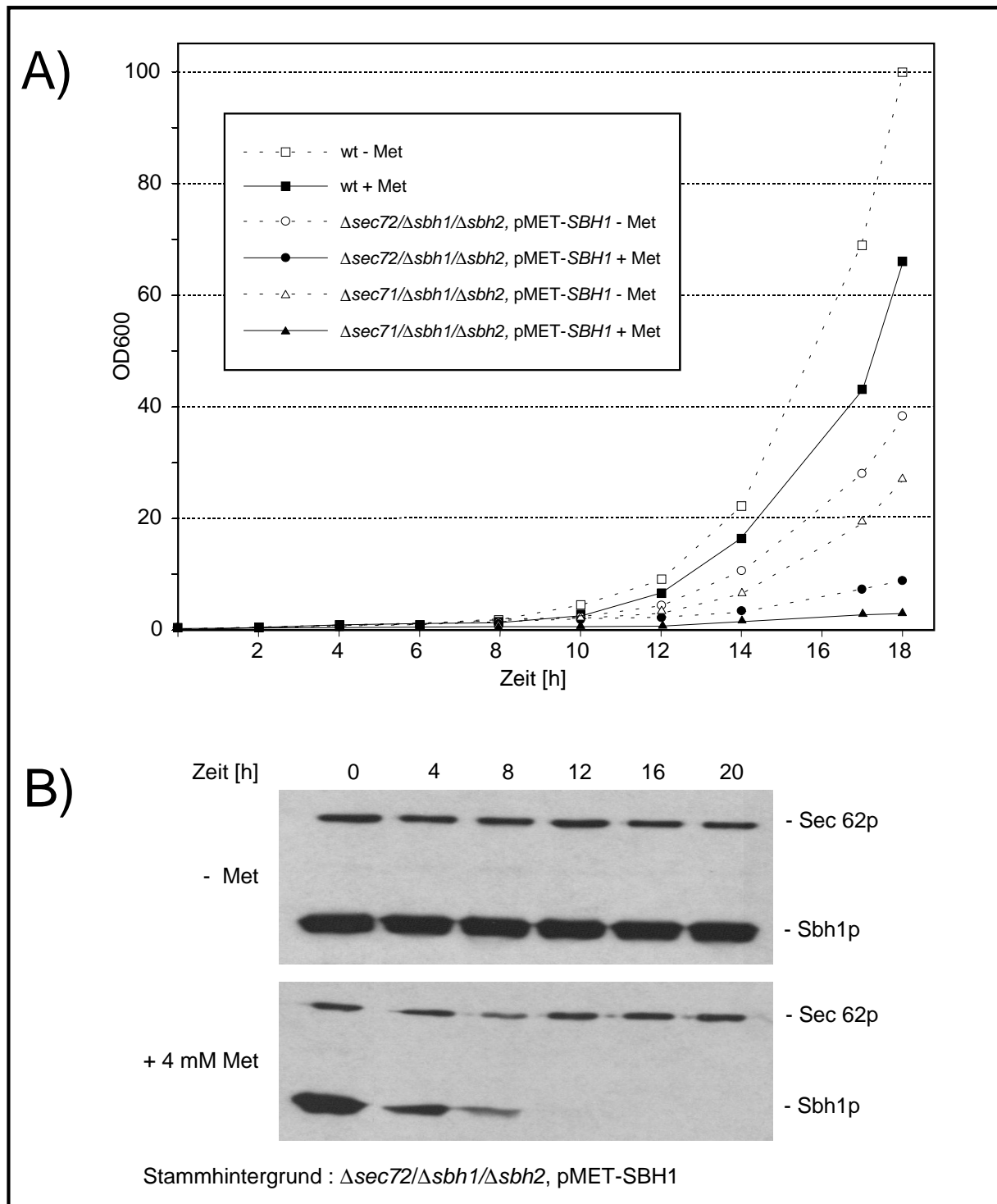
Die Transportdefekte könnten zwei unterschiedliche Ursachen haben: zum einen das Fehlen einer essentiellen Funktion, z.B. im Signalsequenz-Antennenkomplex, zum anderen aber auch eine Instabilität und eventuelle Dissoziation des SEC-Restkomplexes. Auch diese zweite Möglichkeit wird untersucht.

### 3.5.1 Die Stämme $\Delta sec71/\Delta sbh1/\Delta sbh2$ und $\Delta sec72/\Delta sbh1/\Delta sbh2$ zeigen deutliche Transportdefekte.

Um die Akkumulation von Präkursoren zu untersuchen, verwendeten wir drei Modellsubstrate: Carboxypeptidase Y (CPY) und  $\alpha$ -Faktor als Substrate des posttranslationalen Transportweges (Ng et al., 1996) und Invertase als vornehmlich cotranslationales Substrat (Rothe und Lehle, 1998).

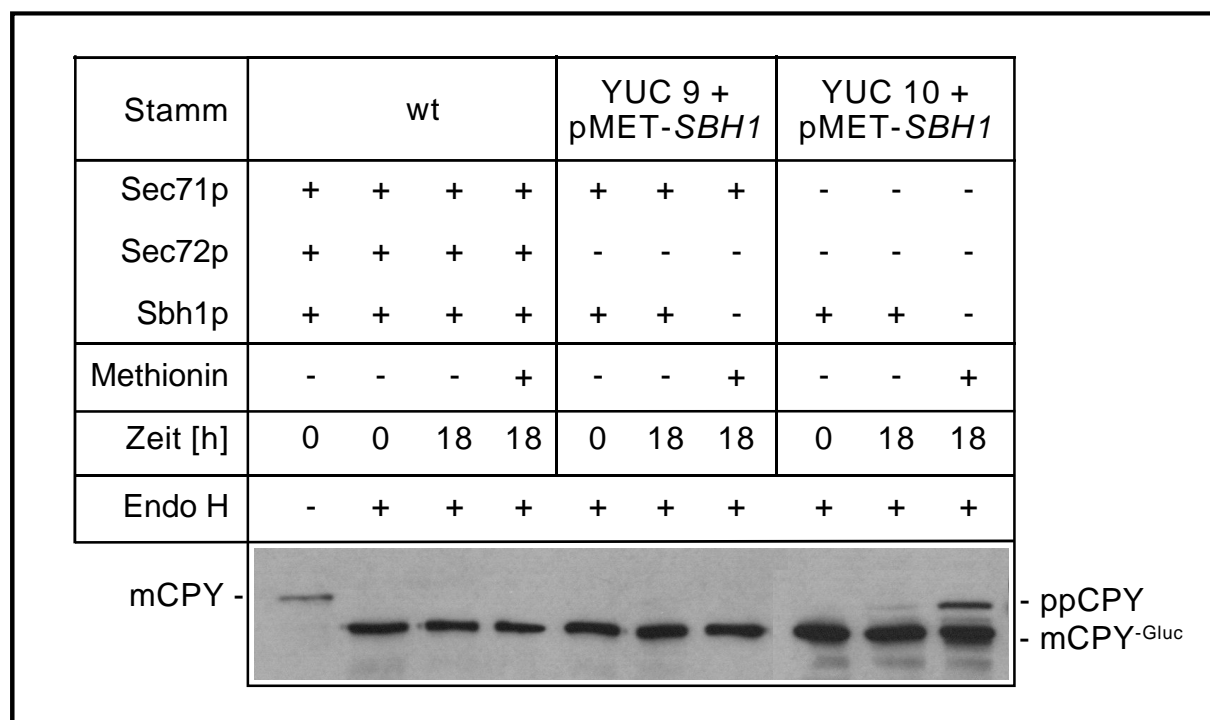
Zu Beginn wurde die Verteilung von CPY sowie ihrer Präkursoren im steady state betrachtet. Um eventuelle Komplementationen durch *Sbh2p* zu verhindern, wurden alle Experimente in  $\Delta sbh2$ -Stämmen durchgeführt. Ein wt-Stamm, sowie YUC 9 + pMET-*SBH1* ( $\Delta sec72/\Delta sbh1/\Delta sbh2$ , pMET-*SBH1*) und YUC 10 + pMET-*SBH1* ( $\Delta sec72/\Delta sbh1/\Delta sbh2$ , pMET-*SBH1*) wurden ausgehend von einer Vorkultur parallel in SD – Methionin und in SD + 4 mM Methionin für 18 Stunden angezogen. Durch die Anzucht in Methionin-haltigem Medium wurde der MET-Promotor repremiert und die synthetisch letalen Phänotypen konnten im folgenden untersucht werden. Abb. 20 zeigt die Entwicklung des *Sbh1*-Proteingehalts während eines Abschaltexperiments. Deutlich zu sehen ist die durch Zugabe von 4 mM Methionin induzierte Abnahme von *Sbh1p*. Bereits 12 Stunden nach der Zugabe von 4 mM Methionin ist der Proteingehalt von *Sbh1p* im Western Blot kaum noch zu detektieren, nach 16 Stunden liegt er unterhalb der Nachweisgrenze. Im Vergleich dazu bleibt die Menge an *Sec62p* konstant.

Um die Verteilung von CPY sowie ihrer Präkursoren im steady state zu vergleichen, dienten Zellen zum Zeitpunkt der Methionin-Zugabe ( $t = 0$ ) als Kontrolle. Die geernteten Zellen wurden aufgeschlossen und das erhaltene Zelllysat in eine Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen Carboxypeptidase Y eingesetzt.



**Abb. 20:** *In vivo* System zur Untersuchung der letalen Hefestämme durch Repremierung des Methionin-Promotors. **A)** Flüssigkulturen der angegebenen Hefestämme wurden aus Methionin-freien Vorkulturen in Minimalmedium +/- 4 mM Methionin mit einer  $OD_{600} = 0,1$  angeimpft. Durch Verdünnen der Kulturen wurde gewährleistet, dass die  $OD_{600}$  über die gesamte Versuchszeit unter 1,0 lag. Die Bestimmung der  $OD_{600}$  erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten, entsprechende Verdünnungsfaktoren wurden bei der Berechnung der Gesamtzelldichte berücksichtigt. **B)** Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 10  $OD_{600}$  Zellen der Kulturen aus A) geerntet, aufgeschlossen und im Western Blot mit Antikörpern gegen Sec62p und Sbh1p getestet. Hier werden die Ergebnisse für den  $\Delta sec72/\Delta sbh1/\Delta sbh2$ , pMET-SBH1-Stamm in Abwesenheit bzw. Gegenwart von 4 mM Methionin gezeigt. Die Daten für den Wildtyp (wt) und den  $\Delta sec71/\Delta sbh1/\Delta sbh2$ , pMET-SBH1-Stamm decken sich mit den gezeigten.

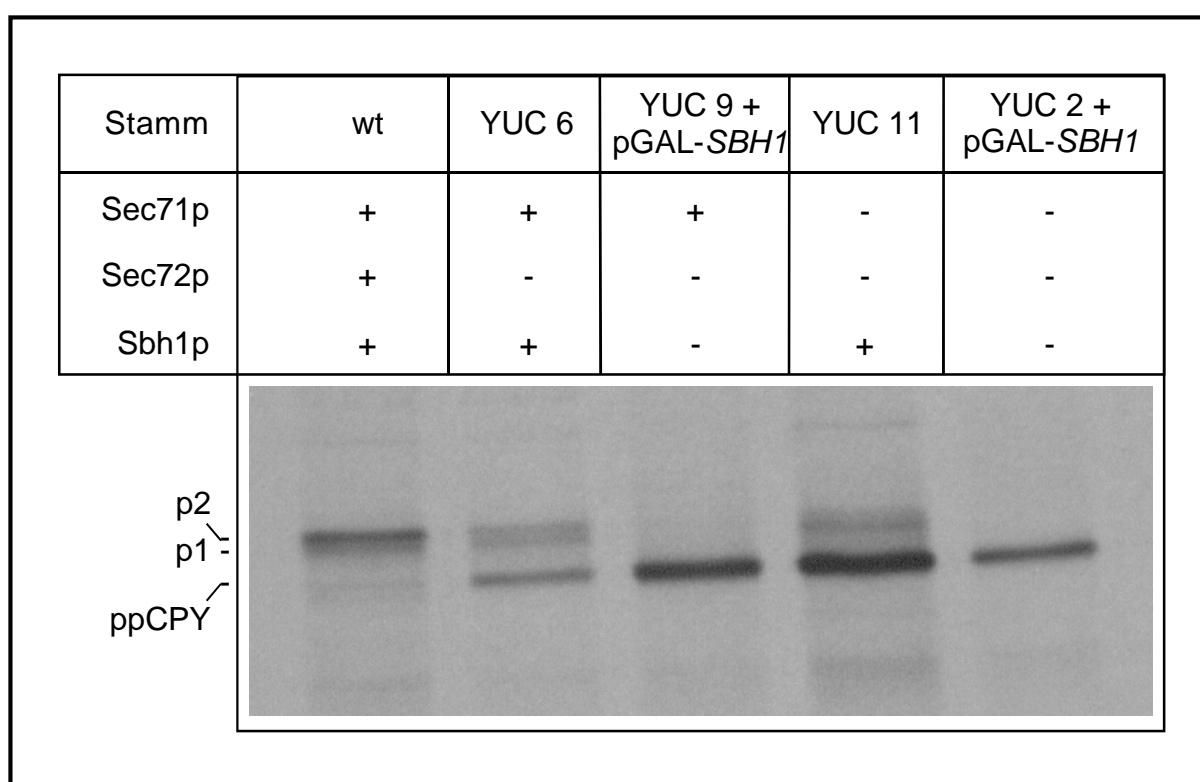
CPY wird als inaktives präpro-CPY (ppCPY) synthetisiert, nach der Translokation in das Lumen des ER wird die Signalsequenz abgespalten, und es folgt im Golgi-Apparat eine Kern-Glykosylierung in zwei Stufen (p1- und p2-Form). Die so entstandene pro-CPY wird in der Vakuole, ihrem Bestimmungsort, durch das Genprodukt von *PEP4* in die aktive CPY proteolytisch gespalten. Durch die zweifache Glykosylierung, die die p1- und p2-Form größer erscheinen läßt als präpro-CPY, und die proteolytische Aktivierung, die ca. 90 Aminosäuren abspaltet, verhält sich das mature CPY (mCPY) in seinem Laufverhalten im SDS-PAGE wie die präpro-CPY. Um dennoch zwischen beiden Formen unterscheiden zu können, wurde nach der Immunpräzipitation eine Deglykosylierung mit der Endoglykosidase H (Endo H) durchgeführt. mCPY läuft dann niedriger als die Präkursorform (ppCPY). Wie in Abb. 21 zu erkennen ist, zeigt unter diesen Bedingungen nur der  $\Delta sec71/\Delta sbh1/\Delta sbh2$ -Genotyp eine Akkumulation der ppCPY im steady state, während der  $\Delta sec72/\Delta sbh1/\Delta sbh2$ -Genotyp keinen Effekt zeigt.



**Abb. 21:** Untersuchung zur Akkumulation von ppCPY im steady state in verschiedenen letalen Stammhintergründen. Hefestämme, wie angegeben, wurden in Minimalmedium mit bzw. ohne 4 mM Methionin angezogen. Nach 18 Stunden Wachstum bei 4 mM Methionin ist der Gehalt an Sbh1p im Western Blot nicht mehr nachweisbar. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden je 50 OD<sub>600</sub> Zellen geerntet und aufgeschlossen. Die Zellysate wurden in eine Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen CPY eingesetzt. Anschließend wurden die an ProteinA Sepharose gebundene mCPY/ppCPY-Fractionen mit Endo H deglykosyliert. Die Deglykosylierung dient der Unterscheidung zwischen mCPY und ppCPY, die ansonsten im SDS-PAGE das gleiche Laufverhalten zeigen. mCPY<sup>-Gluc</sup> = deglykosylierte mCPY.

Der Nachteil einer Präkursor-Bestimmung im steady state ist die Unklarheit über den Zeitpunkt, zu dem das reife Protein expremiert und transloziert wurde. Um die Translokationsfähigkeit der einzelnen Stämme zum Zeitpunkt 18 Stunden bestimmen zu können, dem Zeitpunkt zu dem kein Sbh1p mehr vorhanden ist, wurde der Versuchsansatz wie folgt gewählt: Die Hefestämme YTX 57 (wt), YUC 6 ( $\Delta sec72$ ), YUC 11 ( $\Delta sec71$ ), YUC 9 + pGAL-SBH1 ( $\Delta sec72/\Delta sbh1/\Delta sbh2$ , pGAL-SBH1) und YUC 2 + pGAL-SBH1 ( $\Delta sec71/\Delta sbh1$ , pGAL-SBH1) wurden nach 18 Stunden Repremierung in Glucose-haltigem Minimalmedium wie unter 3.2.2.3 beschrieben für 4 min radioaktiv puls-markiert.

In Abb. 22 ist das Ergebnis einer Pulsmarkierung für Carboxypeptidase Y gezeigt.



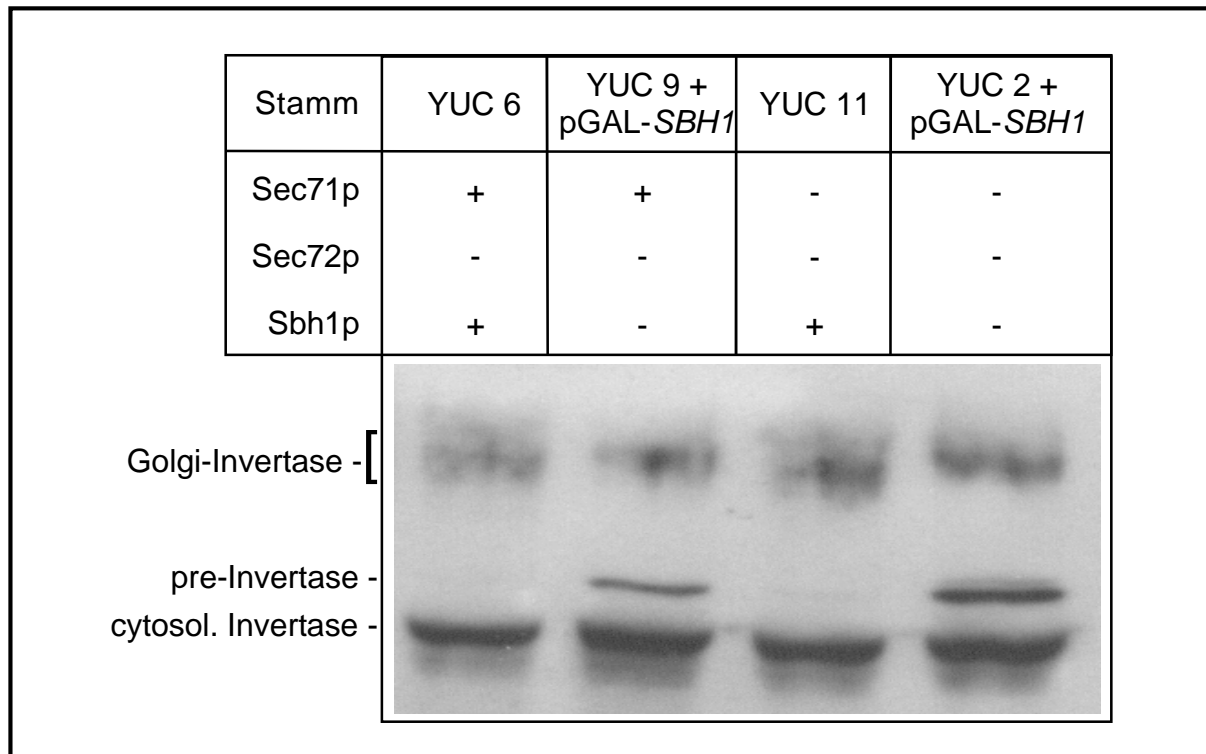
**Abb. 22:** Pulse-Markierung zur Detektion von CPY Präkursor-Akkumulation. Hefen der angegebenen Stämme wurden in SGal-Medium angezogen und für 18 Std. in SD-Medium umgesetzt. Durch Repremierung des GAL-Promotors entstehen die angegebenen Phänotypen. Die Zellen wurden wie im Abschnitt 3.2.2.3 beschrieben 4 min pulse-markiert, aufgeschlossen und in eine Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen CPY eingesetzt. Präzipitiertes CPY wurde im SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe eines Phosphorimagers ausgewertet. Zu sehen sind die unprozessierte präpro-Form des CPY (ppCPY), sowie die einfach bzw. zweifach glykosylierten Golgi-Formen der CPY (p1 bzw. p2).

Die Daten aus der Pulse-Markierung zeigen wesentlich stärkere Präkursor-Akkumulationen als die des steady state. Auch die Stämme YUC 6 und YUC 11 zeigen signifikante Mengen ppCPY. Dies ist konform mit Ergebnissen von Feldheim et al. (1994), die 50 % CPY Präkursor-Akkumulation für einen  $\Delta sec72$ -Stamm beschrieben haben. Fehlt zusätzlich zu

Sec72p auch Sec71p, so ist die Translokationskompetenz weiter herabgesetzt und der Großteil an ppCPY wird nicht transloziert. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, daß Sec71p selbst eine Funktion im Translokationsprozeß übernimmt und nicht nur als Membrananker von Sec72p fungiert. Ähnliches gilt für Sbh1p. In Abwesenheit von Sbh1p sind die verbleibenden Restkomplexe (Sec61p/Sec62p/Sec63p/Sec71p bzw. Sec61p/Sec62p/Sec63p) nicht fähig, ppCPY in das ER zu translozieren. Fehlen Sec72p bzw. Sec71p/Sec72p im SEC-Komplex, so übernimmt Sbh1p eine essentielle Funktion bei der Translokation. Somit scheinen Sbh1p und Sec72p überlappende Funktionen zu besitzen. Das ist insofern interessant, da ein cotranslationaler Transport ohne Sbh1p möglich ist, und Sbh1p als Teil des cotranslationalen Sec61-Komplexes nach diesen Ergebnissen eine Funktion im posttranslationalen Weg übernimmt.

Es ist mit hoher Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß der absolute Translokationsblock die Ursache für den letalen Phänotyp ist. Diese Sichtweise wird auch durch die Untersuchung der Präkursor-Akkumulation von  $\alpha$ -Faktor im steady state unterstützen. Während der Wildtyp keine Präkursor-Akkumulation zeigt, und auch der  $\Delta sec71$ - bzw. der  $\Delta sec72$ -Deletionsstamm keine merklichen Transportdefekte aufweisen, ist in den letalen Mehrfachmutanten  $\Delta sec72/\Delta sbh1/\Delta sbh2$  und  $\Delta sec71/\Delta sbh1/\Delta sbh2$  eine deutliche Ansammlung von präpro- $\alpha$ -Faktor zu detektieren (Daten nicht gezeigt).

Interessant war die Frage, inwieweit sich der Translokationsblock auch auf cotranslationale Substrate auswirkt. Um dies zu klären, wurde die Verteilung von sekretorischer Invertase und ihren Vorläufer-Formen im steady state analysiert. Wie bereits im vorhergehenden Experiment wurden die Hefestämme der Einfach- bzw. Mehrfach-Mutanten aus SGal-Kulturen 18 Std. in SD angezogen, wodurch der GAL-Promotor repremiert wurde. Um eine konstitutive Expression der Invertase auch in Glucose-haltigem Medium zu erreichen, wurde das SUC2-Gen unter Kontrolle des PGK-Promotors auf einem 2 $\mu$ -Plasmid in die Hefen eingeschleust. Die so erhaltenen Hefen wurden geerntet, aufgeschlossen und in eine Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen Invertase eingesetzt.



**Abb. 23:** Präkursor-Akkumulation von pre-Invertase im steady state. Hefestämme, wie angegeben, wurden aus Vorkulturen in SGal für 18 Std. in SD-Medium angezogen. Um eine konstitutive Expression der Invertase auch in Glucose-haltigem Medium zu erreichen, wurde das SUC2-Gen unter Kontrolle des PGK-Promotors auf einem 2 $\mu$ -Plasmid in die Hefen transformiert. Die Zellen wurden geerntet, aufgeschlossen und die Lysate in eine Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen Invertase eingesetzt. Die Auswertung erfolgte durch SDS-PAGE und Western Blot Analyse.

Abb. 23 zeigt für die Mehrfach-Mutanten deutliche Transportdefekte von pre-Invertase als Substrat des cotranslationalen Translokationsystems im steady state. Somit sind nicht nur Substrate des posttranslationalen Translokationswegs durch die Deletion von *SEC72* und *SBH1* betroffen, sondern auch Substrate, die unter wt-Bedingungen den cotranslationalen Weg nehmen.

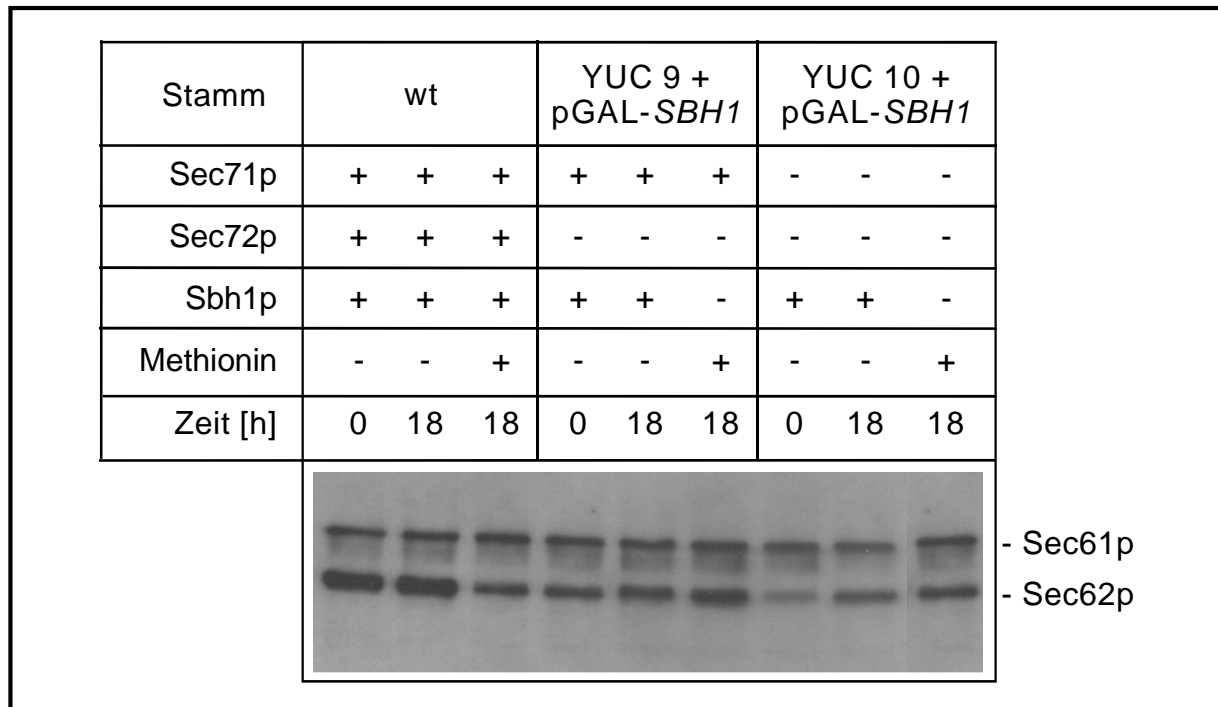
### 3.5.2 Untersuchungen zur Stabilität des posttranslationalen Komplexes

Für die im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Transportdefekte kann es mehrere Ursachen geben. Zum einen kann das Fehlen von Sec71p, Sec72p und Sbh1p direkt eine Funktion des Translokationsmechanismus, z.B. die des Signalsequenz-Antennenkomplexes stören. Zum anderen kann das Fehlen von mehreren Komponenten eines heptameren Proteinkomplexes auch zu einer Destabilisierung des Restkomplexes führen. Im folgenden wurde daher die Stabilität des SEC-Komplexes in Abwesenheit mehrerer Proteine mit Hilfe von Coimmunpräzipitationen untersucht.



Es wurde getestet, ob der verbleibende SEC-Komplex in Abwesenheit von Sec71p, Sec72p und Sbh1p in seine beiden Subkomplexe Sec61-Komplex und Sec62/63-Komplex zerfällt. Dazu wurden ein wt-Stamm, YUC 9 + pMET-*SBH1* ( $\Delta sec72/\Delta sbh1/\Delta sbh2$ , pMET-*SBH1*) und YUC 10 + pMET-*SBH1* ( $\Delta sec71/\Delta sbh1/\Delta sbh2$ , pMET-*SBH1*) in Minimalmedium angezogen. Aus den Vorkulturen wurden je zwei Hauptkulturen in Minimalmedium +/- 4 mM Methionin angeimpft. 4 mM Methionin suppressieren den MET-Promotor, unter dessen Kontrolle das komplementierende *SBH1* steht, so daß sich die bekannten letalen Phänotypen ausprägen. Aus Vorversuchen war bekannt, daß nach 18 Stunden der Proteingehalt an Sbh1p deutlich abgesunken und im Western Blot nicht mehr nachweisbar ist (Daten nicht gezeigt). Von den jeweils zwei Kulturen wurden nach 18 Stunden Zellen geerntet und Membranen nach dem schonenden Zymolyase-Protokoll präpariert (3.2.3.5.2). Als Referenzproben dienten Membranen von Zellen, die vor Zugabe des Methionins geerntet worden waren ( $t = 0$ ). Je 90 eq Membranen wurden mit Hilfe von 1% Digitonin im Hochsalzpuffer solubilisiert und das Solubilisat in eine Coimmunpräzipitation mit Antikörpern gegen Sec62p eingesetzt. Um eine Veränderung in der Assoziation des trimeren Sec61-Komplexes mit dem tetrameren Sec62/63-Komplex zu bestimmen, wurde der Western Blot der Coimmunpräzipitationen auf die Anwesenheit von Sec61p und Sec62p getestet. Nur wenn die verbleibenden Subkomplexe auch nach Abschalten des *SBH1* assoziieren, sollte Sec61p mit Antikörpern gegen Sec62p copräzipitiert werden (Abb. 24).

Wie Abb. 24 zu entnehmen ist, wird die Wechselwirkung zwischen Sec61p und Sec62p, die hier stellvertretend für die jeweiligen Subkomplexe betrachtet werden, durch das Fehlen von Sec71p, Sec72p und Sbh1p nicht beeinflußt.



**Abb. 24:** Der SEC-Restkomplex ist in Abwesenheit von Sec71p, Sec72p und Sbh1p stabil. Membranen der angegebenen Stämme wurden zu den Zeitpunkten 0 bzw. 18 Std. geerntet. 90 eq entsprechender Membranpräparationen wurden unter 1% Digitonin im Hochsalzpuffer (siehe 3.2.2.2) solubilisiert und mit einem Antikörper gegen Sec62p gefällt. Präzipitate entsprechend 25 eq wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot auf die Anwesenheit von Sec61p und Sec62p getestet. Gefragt wurde, ob im SEC-Restkomplex in Abwesenheit von Sec71p, Sec72p und Sbh1p immer noch eine Sec61p x Sec62p Interaktion nachweisbar ist.

Daraus kann geschlußfolgert werden, daß eine Destabilisierung des Zusammenhalts zwischen dem trimeren Sec61p-Komplex (der nach dem Abschalten von *SBH1* nur noch aus Sec61p und Sss1p besteht) und dem tetrameren Sec62/63-Komplex (der nur noch aus Sec62p und Sec63p besteht) im Falle der synthetisch letalen Phänotypen nicht der Grund für die Transportdefekte von ppCPY, pre-Invertase und pp $\alpha$ -Faktor ist. Vielmehr handelt es sich dabei um direkte Transportdefekte, die durch das Fehlen von Sec72p und Sbh1p bzw. Sec72p, Sec71p und Sbh1p verursacht werden.

## 4 Diskussion

Die hier vorgelegte Arbeit beschäftigt sich mit dem posttranslationalen Transport in das ER der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Der besondere Fokus liegt auf der Untersuchung von Sec71p, Sec72p und Sbh1p, drei Proteinen, die größtenteils cytosolisch orientiert sind und deren Funktion bei der posttranslationalen Translokation bisher ungeklärt ist.

Lyman und Schekman (1997) haben das Modell eines Signalsequenz-Antennenkomplexes, bestehend aus Sec62p, Sec71p und Sec72p, vorgeschlagen. Ein solcher Signalsequenz-Antennenkomplex wäre der erste Kontaktpunkt eines posttranslationalen Transportsubstrats und eventueller Targeting-Faktoren mit dem SEC-Komplex.

### 4.1 Die verschiedenen Domänen des Sec71p und ihre Funktionen

Einen Schwerpunkt dieser Arbeit bildet die Analyse von wichtigen Bereichen des Sec71p für die Assoziation mit dem SEC-Komplex und für die Komplementation einer  $\Delta sec71/\Delta sbh1$  Doppelmuntante. Durch Einsatz sowohl N- als auch C-terminal verkürzter Varianten von Sec71p wurden entsprechende funktionelle Domänen von Sec71p identifiziert. Sowohl für die Bindung von Sec72p, als auch für die Assoziation mit dem SEC-Komplex ist ein Bereich von Pos. 120 bis Pos. 160 des Sec71p minimal notwendig. Die Hinzunahme des angrenzenden C-terminalen Sequenzbereichs bis Pos. 180 steigert die Effizienz der beiden Funktionen.

Wie mittels Coimmunpräzipitationen von Sec71p mit Antikörpern gegen Sec62p in einem  $\Delta sec72$ -Hintergrund gezeigt werden konnte, ist die Assoziation der beiden Proteine im SEC-Komplex unabhängig von der Anwesenheit von Sec72p.

Eine N-terminal verkürzte Variante Sec71<sup>1-120</sup>p bindet weder Sec72p (Abb. 8), noch kann sie mit Antikörpern gegen Sec62p coimmunpräzipitiert werden (Abb. 10). Wie von Feldheim et al. (1994) bekannt, wird Sec72p in Abwesenheit von Sec71p mit einer Halbwertszeit von ca. 12 min degradiert. Eine Sec71-Variante ohne Sec72p-Bindungsstelle verursacht somit einen zusätzlichen  $\Delta sec72$ p Phänotyp. Da die Kombination  $\Delta sbh1/\Delta sec72$  letal ist (Abb. 14), muß aufgrund des Abbaus von Sec72p in Anwesenheit der Sec71<sup>1-120</sup>p-Variante zwangsläufig auch  $\Delta sbh1/\Delta sec71/SEC71^{1-120}$  letal sein. Es bleibt zu klären, ob die Abwesenheit von Sec72p der einzige Grund für die Unfähigkeit von Sec71<sup>1-120</sup>p ist, einen  $\Delta sbh1/\Delta sec71$ -Stamm zu komplementieren.

Durch Ersetzen des N-terminalen Membranankers von Sec71p durch die P450Cm1-Membranankerdomäne von *Candida maltosa* wurde die Bedeutung des Transmembranbereichs von Sec71p getestet. Zum Vergleich wurde eine Sec71p-Variante ohne Membrananker und luminalen Teil betrachtet.

Der Versuch einer Komplementation eines  $\Delta sbh1/\Delta sec71$ -Stamms mit den drei Fusionsproteinen bzw. einer Sec71p-Variante ohne Membrananker und luminalen Teil zeigte, daß der cytosolische Teil von Sec71p genügt, um für das wt-Protein zu komplementieren, und daß der Membrananker dazu nicht notwendig ist. Andererseits wirkt sich der Austausch gegen einen fremden Membrananker, in diesem Fall den des P450Cm1 aus *C. maltosa*, negativ auf die Funktionalität des Sec71p aus. Die drei Fusionsproteine können daher den  $\Delta sbh1/\Delta sec71$ -Stammhintergrund nicht komplementieren. Der Membrananker des Sec71p ist somit nicht essentiell, aber seine Struktur von Bedeutung für die korrekte Integration in den SEC-Komplex.

Interessant und aufschlußreich sind auch die Glykosylierungsmuster der verwendeten myc-Fusionsproteine. Es ist offensichtlich, daß durch N-terminale Fusion des 3x-myc-Epitops der Grad der vollständigen Glykosylierung deutlich abnimmt (Abb. 10). Betrachtet man das Verhalten der unterschiedlich glykosylierten Formen in den Coimmunpräzipitationen mit Antikörpern gegen Sec62p, so fällt auf, daß vornehmlich die vollständig glykosylierten Varianten zusammen mit Sec62p gefällt werden, obwohl sie teilweise nur einen Bruchteil an der Gesamtpopulation des Sec71-myc Fusionsproteins ausmachen (Abb. 10). Die vollständige Glykosylierung scheint somit ein Indikator für die korrekte Orientierung in der Membran und für die Assoziation mit dem SEC-Komplex zu sein. Betrachtet man unter diesem Aspekt die P450-Membranankerkonstrukte, so ist der P450Cm1-Membrananker von *C. maltosa* nicht in der Lage, sich problemlos in den SEC-Komplex zu integrieren.

Die Versuche mit den P450-Sec71p-myc Konstrukten bestätigten auch, daß der cytosolische Teil von Sec71p ausreicht, um Sec72p zu binden. Selbst ein Fusionsprotein, daß nur die letzten 46 Aminosäuren von Sec71p enthielt, war zu einer eingeschränkten Bindung von Sec72p fähig (Abb. 12).

Zusammenfassend kann man sagen, daß sich Sec71p in mindestens zwei Domänen mit unterschiedlichen Funktionen unterteilen läßt:

- Den cytosolischen C-Terminus, der verantwortlich ist für die Bindung von Sec72p, die Assoziation mit Sec62p und die Komplementation eines  $\Delta sec71/\Delta sbh1$ -Stamms.
- Den Membrananker, der nicht essentiell ist, dessen Struktur aber wichtig für eine korrekte Integration in den SEC-Komplex ist, und der nicht durch einen beliebigen Membrananker ersetzt werden kann.
- Darüber hinaus bietet der luminaire Teil, mit seinen zwei Glykosylierungsorten die Möglichkeit die korrekte Integration in die Membran zu beurteilen.

#### **4.2 Sec72p besitzt eine potentielle Interaktionsstelle für cytosolische Proteine**

Sec72p ist die einzige Komponente des SEC-Komplexes, die keine Transmembrandomäne besitzt und ein peripheres Membranprotein mit ungewöhnlicher Bindung an die ER-Membran darstellt. Unter Bedingungen, die andere periphere Membranproteine von der Membran ablösen (pH = 11 oder 500 mM NaCl), bleibt Sec72p unverändert mit dem SEC-Komplex assoziiert (Abb. 17).

Sequenzvergleiche von Sec72p mit anderen Proteinen zeigten im C-terminalen Bereich von Sec72p eine Aminosäuresequenz mit Ähnlichkeit zu einer TPR-Domäne. TPR-Domänen sind als Protein-Interaktionsdomänen beschrieben. In der Regel kommt die Konsensus-Sequenz aus 34 Aminosäuren zwischen drei und zwölf Mal in einem Protein vor (für einen Überblick siehe Goebel und Yanagida, 1991). Für Proteine mit TPR-Domänen sind Beteiligungen an der Mitose, der Transkription und auch am Proteinimport in Mitochondrien und Peroxisomen nachgewiesen. *S.c.*Tom70p als Teil des mitochondrialen Translokationskomplexes ist ein Protein mit 7 TPRs (Woolford, 1989). *S.c.*Pas10p interagiert mit der peroxisomalen Targetingsequenz und ist ebenfalls ein Protein mit mehreren TPR Domänen (Brocard et al., 1994). Außerdem zeigten Radanyi et al. (1994), daß das Immunophilin FKBP59-HBI mit Hsp90 durch seine TPR-Domänen interagiert. Sec72p besitzt nur eine einzelne TPR-Domäne, mit eingeschränkter Ähnlichkeit zu der TPR-Konsensus-Sequenz. Die Deletion dieser TPR-Domäne des Sec72p führt zu einem Funktionsverlust. Dieser Funktionsverlust kommt phänotypisch erst zum Tragen, wenn Sec72 $\Delta$ TPRp mit einer *SBH1*-Deletion kombiniert wird,

dann aber ist er synthetisch letal. Experimente zur Membran-Anlagerung von Sec72 $\Delta$ TPRp haben bewiesen, daß die TPR-Domäne nicht für die Interaktion mit dem SEC-Komplex notwendig ist. Sec72 $\Delta$ TPRp zeigt wie das wt-Protein eine Alkali- und Hochsalz-resistente Anlagerung an Sec72p-freie Membranen (Abb. 17). Außerdem ist seine Anlagerung an die Membran, wie auch die des nativen Sec72p, abhängig von der Anwesenheit von Sec71p (Daten nicht gezeigt). Somit bleibt die TPR-Domäne des Sec72p eine potentielle Stelle für Wechselwirkungen mit Signalsequenzen, cytosolischen Chaperonen oder Proteinen eines posttranslationalen Targetingmechanismus.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, bisher unbekannte Interaktionspartner von Sec72p zu identifizieren. Die Versuche zur photochemischen Quervernetzung unterstrichen die räumliche Nähe zu Sec71p. Die Durchführung eines Screen zur Identifizierung synthetisch letaler Mutanten bestätigte die Coletalität von  $\Delta$ sec72 mit  $\Delta$ sbh1. Beide Ansätze führten nicht zur Identifizierung neuer Interaktionspartner von Sec72p. Diese Ergebnisse sind jedoch nicht gleichbedeutend mit dem Fehlen derartiger Wechselwirkungen. Beide experimentellen Ansätze haben ihre Grenzen und müssen daher nicht notwendigerweise zur Identifizierung neuer Proteine führen.

Sind es z.B. mehrere Interaktionspartner, die sich in ihrer Funktion überlagern und ersetzen können, so ist es sehr unwahrscheinlich, daß sie im Rahmen eines synthetisch letalen Screens identifiziert werden. Dazu wäre es notwendig, störende Mutationen in allen Interaktionspartnern gleichzeitig zu setzen. Für die photochemische Quervernetzung gilt, daß sie vor allem geeignet ist für stabile, langanhaltende Wechselwirkungen. Je kürzer die räumliche Interaktion, desto geringer ist die Ausbeute an Quervernetzungsprodukt. Das gleiche gilt für den Fall, daß es mehrere verschiedene Interaktionspartner gibt. Die Ausbeute an Quervernetzungsprodukt verteilt sich dann auf alle möglichen Wechselwirkungspartner und geht somit zu Lasten der Detektierbarkeit einzelner Banden.

Ein möglicher Ansatz, um in zukünftigen Experimenten eventuelle posttranslationale Targetingfaktoren zu identifizieren, wäre die Durchführung eines high-copy Suppressor Screens. Die Kombination der Einzelmутanten und der synthetisch letale Screen haben ergeben, daß  $\Delta$ sec72 und  $\Delta$ sbh1 coletal sind. Wie weiter unten diskutiert wird, könnte dies durch eine überlappende Funktion beim Signalsequenz-Erkennungsmechanismus bedingt sein. Eine solche Störung könnte sich durch einen erhöhten Gehalt an Targetingfaktoren beheben lassen. Deshalb wäre es sinnvoll, einen regulierbaren  $\Delta$ sec72/ $\Delta$ sbh1-Doppeldeletionsstamm mit einer genomischen high copy Bank zu transformieren, um zu untersuchen, ob es ein Gen gibt, das in erhöhter Konzentration für  $\Delta$ sec72/ $\Delta$ sbh1

komplementieren kann. Potentielle Kandidaten wären die Mitglieder der SSA-Familie und andere Chaperone. *SEC72*, *SBH1* und *SBH2* wären interne Positivkontrollen.

Photochemische Quervernetzungsexperimente haben gezeigt, daß sich Sec72p mit Sec71p kovalent verknüpfen läßt. Alle anderen getesteten Komponenten des SEC-Komplexes wurden nicht zu Sec72p quervernetzt (Abb. 18 und Abb. 19). Dieser Befund bestätigt, daß die starke Bindung an die Membran vor allem von Sec71p vermittelt wird. Das ist konform mit der Beobachtung, daß Sec72p in einem  $\Delta sec71$  Stammhintergrund nicht an der Membran bzw. im SEC-Komplex gefunden wird (Feldheim et al. (1994), Abb. 8 diese Arbeit).

Während alle bekannten Daten dafür sprechen, daß Sec71p und Sec72p eine Rolle während der Translokation in das ER ausüben, findet man sie in der Literatur auch in anderen Zusammenhängen:

In einem genetischen Screen zur Regulation der DNA-Replikation während der Mitose wurde *SEC72* als *SIM2* (SIM = ‘start independent of mitosis’) gefunden (Dahmann, C. et al., 1995). Ein Hefestamm der in den Genen *CLB1* bis *CLB4* deletiert ist, repliziert nur einmal seine DNA und kann nicht in eine Mitose eintreten. Eine Mutation in *SIM2* (= *SEC72*) ermöglicht es diesem Stamm seine DNA ein weiteres Mal zu replizieren. Es liegt der Verdacht nahe, daß es sich um einen indirekten Effekt handelt, der durch die Mißlokalisierung von Proteinen des sekretorischen Weges (dazu gehören auch integrale Proteine der Kernmembran) auftritt. Denkbar wäre aber auch eine Mutation im Bereich der TPR-Domäne von Sec72p, die dann mit TPR-Domänen von Proteinen, die an der Regulation der Mitose beteiligt sind, konkurrieren könnte und dadurch den Level an wichtigen Steuerungsfaktoren herabsetzt. Um dies zu klären, wäre es hilfreich mehr über die Mutation im *SIM2* zu erfahren. Eine direkte Rolle von Sec72p in der Mitose ist sehr unwahrscheinlich.

In zwei Veröffentlichungen (Brizzio et al., 1999; Ng und Walter, 1996) werden Sec63p, Sec71p, Sec72p und Kar2p als Beteiligte an der Verschmelzung von Kernmembranen nach einer Zellfusion beschrieben. *SEC63*, *KAR2* und *KAR7* (= *SEC71*) wurden in einem genetischen Screen zur Kernfusion gefunden. Weder Brizzio et al. Noch Ng und Walter präsentieren Daten, in denen sie eine Assoziation eines der vier Proteine mit Komponenten der Kernfusionsmaschinerie zeigen. Einen einfachen Translokationsdefekt als Ursache schließen sie aus, da Mutanten von *SEC61* und *SEC62* deutlich stärkere Translokationsdefekte als *SEC63*, *KAR2*, *SEC71* und *SEC72* aber keine Hemmung der Kernmembranverschmelzung zeigen. Meiner Meinung nach handelt es sich bei den

beobachteten Defekten dennoch um indirekte Auswirkungen einer Translokationshemmung. Bis heute ist ungeklärt, ob bestimmte Substrate auf einige Komponenten des SEC-Komplexes mehr angewiesen sind als andere, vergleichbar der Abhängigkeit von TRAMP im cotranslationalen Transport. Es ist denkbar, daß integrale Membranproteine, die notwendig für die Verschmelzung der Kernmembranen sind, stärker von Mutationen in *SEC63*, *KAR2*, *KAR7* oder *SEC72* betroffen sind als andere Transportsubstrate. Ein Beispiel könnte Kar5p sein, dessen mRNA in Northern Blots detektiert werden kann, daß aber in einem  $\Delta sec71$ -Stamm in der Zelle nicht nachweisbar ist (Brizzio et al., 1999). Wahrscheinlicher als daß Sec71p zur Stabilisierung von Kar5p gebraucht wird, ist, daß Kar5p in Abwesenheit von Sec71p nicht in die Membran integriert werden kann und deswegen degradiert wird. Eine direkte Beteiligung der genannten Komponenten des Translokationsapparates an der Verschmelzung der Kernmembranen halte ich für eher unwahrscheinlich.

### **4.3 Synthetische Letalität als Indikator für Interaktionen und ergänzende Funktionen**

Die Kombinationen der Deletionsmutanten von *SEC71* und *SEC72* mit Nullmutanten von *SBH1* bzw. *SBH2* führten zu den coletal Genotypen  $\Delta sec71/\Delta sbh1$  bzw.  $\Delta sec72/\Delta sbh1$  und zu den vitalen Genotypen  $\Delta sec71/\Delta sbh2$  bzw.  $\Delta sec72/\Delta sbh2$ . Diese Doppeldeletionsmutanten ermöglichen eine Reihe von Aussagen über die Bedeutung von Sbh1p und Sbh2p im co- bzw. posttranslationalen Transport. Synthetische Letalität ist nach Huffacker et al. (1987) ein Indiz für die Beteiligung zweier Proteine an einem gemeinsamen Stoffwechsel- oder Transportweg. Demnach sind Sec71p, Sec72p und Sbh1p an einem gemeinsamen Transportweg beteiligt, während Sbh2p in ein anderes Transportsystem eingebunden ist. Dies bestätigen Daten von Finke et al. (1996), die zeigen, daß die beiden homologen Beta-Untereinheiten sich trotz ca. 50% Identität der Aminosäuren nicht gegenseitig ersetzen können. Die vorliegende Arbeit belegt, daß Sbh2p in einem letalen  $\Delta sbh1/\Delta sec71$ -Hintergrund eher im Ssh1-Komplex assoziiert bleibt, als im Sec61-Komplex für Sbh1p zu komplementieren. Das dies prinzipiell möglich ist, zeigt der  $\Delta sbh1/\Delta sec71/\Delta ssh1$  -Stamm, in dem Sbh2p in Abwesenheit seines eigentlichen Bindungspartners in Assoziation mit dem SEC-Komplex gefunden wird und den letalen Phänotyp komplementiert (Abb. 5).



Mit biochemischen Versuchen wurde gezeigt, daß Sec71p und Sec72p Bestandteil des posttranslationalen Translokationswegs sind. Welche Rolle aber spielt Sbh1p bei der Translokation in das ER? Sbh1p ist sowohl Bestandteil des cotranslationalen Sec61-Komplexes als auch des posttranslationalen SEC-Komplexes. Eine Einzeldelletion von *SBH1* zeigt keinen Phänotyp, so daß Sbh1p allein weder im co- noch im posttranslationalen Transport essentiell ist. Experimente zur Akkumulation von präpro- $\alpha$ -Faktor – nach Ng et al. (1996) ein posttranslationales Substrat – im  $\Delta sbh1$ -Stamm haben keine Anhäufung von Präkursoren gezeigt. Erst wenn zusätzlich *SBH2* deletiert wird, und der cotranslationale Transport sowohl im Sec61-Komplex als auch im Ssh1-Komplex beeinträchtigt ist, kommt es zur Akkumulation von posttranslationalen Substraten (proOmpA und präpro- $\alpha$ -Faktor) (Finke et al., 1996). Diese Präkursoren-Akkumulation ist dabei wahrscheinlich das Produkt eines erhöhten posttranslationalen Transportaufkommens bei vermindertem cotranslationalen Transport.

Einzeldelentionsmutanten von *SEC71* bzw. *SEC72* sind unter normalen Wachstumsbedingungen ebenfalls nicht essentiell für das Wachstum der Zelle. Aus den coletalen Genotypen  $\Delta sec71/\Delta sbh1$  bzw.  $\Delta sec72/\Delta sbh1$  läßt sich allerdings ableiten, daß Sec71p und Sec72p in Abwesenheit von Sbh1p notwendig für das Überleben der Zelle sind. Andersherum ist Sbh1p in einem  $\Delta sec71$  bzw.  $\Delta sec72$  –Hintergrund essentiell.

Eine naheliegende Schlußfolgerung ist, daß Sbh1p in Abwesenheit von Sec71p und/oder Sec72p eine tragende Funktion im posttranslationalen Transport einnimmt. Wäre dies nicht der Fall, und Sbh1p wäre nur für den cotranslationalen Weg wichtig, dürfte sich die Präkursor-Akkumulation eines posttranslationalen Substrates im letalen  $\Delta sec72/\Delta sbh1$ -Hintergrund nicht wesentlich von der eines  $\Delta sec72$ -Stamms unterscheiden. Abb. 21 bis Abb. 23 im Kapitel 4.5 zeigen dagegen die deutlichen Unterschiede in der Präkursor-Akkumulation dieser beiden Stämme.

Über die Rolle von Sbh1p und Sbh2p im Translokationsprozeß gibt es derzeit keine konkreten Vorstellungen. Daten aus dem homologen Säuger-System erlauben dennoch erste Vermutungen.

Bei Untersuchungen zur Rolle von Sec61 $\beta$  im cotranslationalen Transport der Säuger haben Kalies et al. (1998) Proteoliposomen von Sec61 $\beta$  depletierten und dadurch eine starke Reduzierung der Translokationseffizienz erzeugt. Dieser Defekt konnte behoben werden, wenn die Proteoliposomen vor dem eigentlichen Translokationsprozeß zusammen mit dem Transportsubstrat auf Eis inkubiert wurden, und somit für den Insertionsschritt der

naszierenden Kette in das Translokon mehr Zeit war. Demnach hat die Beta-Untereinheit eher eine Funktion bei der Insertion des Polypeptids in das Translokon als bei der darauffolgenden Translokation durch die Pore.

In Quervernetzungsexperimenten mit cotranslationalen Transportsubstraten wurden in Abhängigkeit von der Kettenlänge zuerst Verknüpfungen zu Sec61 $\beta$  und dann zu Sec61 $\alpha$  beschrieben (Laird und High, 1997). Dies ist ein weiterer Hinweis für eine Beteiligung der Beta-Untereinheit an einem sehr frühen Schritt der Translokation.

Aus diesen Daten läßt sich ableiten, daß Sbh1p und Sec71p/Sec72p im posttranslationalen Transport eine gemeinsame essentielle Funktion übernehmen, daß es sich dabei um einen frühen Schrittes der Translokation handelt, und daß Sbh1p und Sec71p/Sec72p sich aufgrund von ergänzenden bzw. überlappenden Funktionen gegenseitig im SEC-Komplex ersetzen können.

Es ist somit folgendes Modell vorstellbar: Ein posttranslationales Substrat bindet zuerst an den Signalsequenz-Antennenkomplex aus Sec72p, Sec71p und Sec62p und wird dann an Sbh1p weitergereicht. Sbh1p stabilisiert die Anlagerung der Signalsequenz an das Translokon und ermöglicht eine effiziente Translokation. In Abwesenheit von Sbh1p reicht die Funktion des Signalsequenz-Antennenkomplexes aus, um die Signalsequenz mit dem SEC-Komplex zu assoziieren. In Abwesenheit von Sec71p und/oder Sec72p kann der verbleibende Signalsequenz-Antennenkomplex aus Sec62p (im Falle des  $\Delta sec71$ -Stammes) bzw. Sec62p und Sec71p (im Falle des  $\Delta sec72$ -Stammes) die Signalsequenz ausreichend binden, um eine stabile Integration der Signalsequenz in das Translokon durch Sbh1p und somit eine Translokation zu ermöglichen.

Für Sec62p ergibt sich daraus eine zentrale Rolle im Signalsequenz-Antennenkomplex, der seine Funktion bei normalen Wachstumsbedingungen nur in Anwesenheit von Sec62p ausüben kann. Erst bei einer Wachstumstemperatur von 17°C ist *SEC62* nicht mehr essentiell für die Zelle (Deshaies et al., 1989). Der posttranslationale Targetingprozeß ist dann wahrscheinlich so stark verlangsamt, daß die Effizienz der Interaktion des Transportsubstrates mit dem Translokon auch ohne Signalsequenz-Antennenkomplex ausreicht für einen erfolgreichen Membrandurchtritt.

#### **4.4 Sind Sec71p/Sec72p und die Beta-Untereinheit des Translokons analoge Proteine ?**

Die ergänzende Funktion von Sec71p/Sec72p und Sbh1p in einem frühen Schritt der Translokation ist ein überraschender Befund. Die hier präsentierten Daten passen sich in das Modell eines Signalsequenz-Antennenkomplexes – wie es von Lyman und Schekman (1997) vorgeschlagen wurde – ein. Sie ergänzen es jedoch um eine wichtige Funktion für Sbh1p, das in Abwesenheit von Sec71p oder Sec72p essentiell für den posttranslationalen Transport wird und einen unvollständigen Signalsequenz-Antennenkomplex komplementieren kann. Die ergänzende bzw. überlappende Funktion von Sbh1p und Sec71p/Sec72p ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auch der Grund, warum sie nicht in den bisher durchgeführten genetischen Screens als essentiell für die Zelle gefunden wurden.

In *S. cerevisiae* kennt man drei destinkte Translokationskomplexe, die nebeneinander vorliegen und sowohl cotranslationalen, als auch posttranslationalen Transport durch die ER-Membran ermöglichen. Auf der Suche nach Homologen des posttranslationalen Sec62/63-Subkomplexes wurden in *Drosophila* ein essentielles Sec62-Homologes (Noel und Cartwright, 1994) und im Hund Homologe zu *S.c.SEC62* und *S.c.SEC63* (Skowronek et al., 1999; Woollatt et al., 1999; H. Meyer, persönliche Mitteilung) gefunden. Homologe zu *S.c.SEC71* und *S.c.SEC72* wurden bisher nicht entdeckt. Aufgrund der zahlreichen Genom-Projekte erscheint es mit fortschreitender Zeit immer unwahrscheinlicher, daß entsprechende Homologe zu *S.c.SEC71* bzw. *S.c.SEC72* außerhalb des Reichs der Pilze noch gefunden werden.

Höhere Eukaryonten translozieren bekanntermaßen vornehmlich cotranslational in das ER. Es wäre daher vorstellbar, daß sie auf die spezialisierte Funktion von Sec71p/Sec72p-Homologen während eines posttranslationalen Transports verzichten können, und gegebenenfalls die jeweilige Beta-Untereinheit die Funktion im Signalsequenz-Antennenkomplex übernimmt.

In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß Sec61 $\beta$  aus dem Hund einen  $\Delta sec71/\Delta sbh1$ -Doppeldeletionsstamm bei 25°C komplementieren kann (Abb.5). Wie schon für Sbh1p im  $\Delta sec71$ -bzw.  $\Delta sec72$ -Hintergrund argumentiert, muß auch Sec61 $\beta$  bei 25°C im  $\Delta sec71/\Delta sbh1$ -Stamm eine wichtige Rolle im posttranslationalen Transport von *S. cerevisiae* übernehmen, um den letalen Hintergrund zu retten. Sec61 $\beta$  des Hundes ist somit prinzipiell in der Lage eine posttranslationale Funktion zu erfüllen.

Weitere Untersuchungen des posttranslationalen Transports und der beteiligten Proteine im Säuger bzw. anderen höheren Eukaryonten werden zeigen müssen, inwiefern es funktionelle

---

Homologe von *S.c. Sec71* und *S.c. Sec72* in anderen Organismen gibt, oder ob sich das Modell der Austauschbarkeit von Beta-Untereinheit und Sec71p/Sec72p im posttranslationalen Transport bestätigt.

## 5 Literaturverzeichnis

- Andersson, H. and Heijne, G. von (1994). Membrane protein topology: effects of  $\Delta \mu_{H^+}$  on the translocation of charged residues explain the 'positive inside' rule. *EMBO J.*, Vol. 13, 2267-2272.
- Atencio, D.A. and Yaffee, M.P. (1992). MAS5, a yeast homolog of DnaJ involved in mitochondrial protein import. *Mol. Cell. Biol.*, Vol. 12, 283-291.
- Becker, J. et al. (1996). Functional interaction of cytosolic hsp70 and a DnaJ-related protein, Ydj1p, in protein translocation in vivo. *Mol. Cell. Biol.*, Vol. 16, 4378-4386.
- Beckmann, R. et al. (1997). Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the ribosome-Sec61 complex. *Science*, Vol. 278, 2123-2126.
- Brizzio, V. et al. (1999). Genetic interactions between KAR7/SEC71, KAR8/JEM1, KAR5, and KAR2 during nuclear fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, Vol. 10, 609-626.
- Brocard, C. et al. (1994). The tetratricopeptide repeat domain of the PAS10 protein of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for binding the peroxisomal targeting signal – SKL. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 204, 1016-22.
- Brundage, L. et al. (1990). The purified *E. coli* integral membrane protein SecY/E is sufficient for reconstitution of SecA-dependent precursor protein translocation. *Cell*, Vol. 62, 649-57.
- Brundage, L. et al. (1992). SecY, SecE, and band 1 form the membrane-embedded domain of *Escherichia coli* preprotein translocase., *J. Biol. Chem.*, Vol. 267, 4166-4170.
- Brunelli, J.P. and Pall, M.I. (1993). A series of yeast shuttle vectors for expression of cDNAs and other DANN sequences. *Yeast*, Vol. 9, 1299-1308.
- Caplan, A.J. and Douglas, M.G. (1991). Characterization of YDJ1: A yeast homologue of the bacterial dnaJ protein. *J. Cell Biol.*, Vol. 114, 609-621.
- Chirico, W. J. et al. (1988). 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature*, Vol. 322, 805-810.
- Connolly, T. and Gilmore, R. (1989). The signal recognition particle receptor mediates the GTP-dependent displacement of SRP from the signal sequence of the nascent polypeptide. *Cell*, Vol. 57, 599-610.
- Connolly, T. et al. (1989b). Access of proteinase K to partially translocated nascent polypeptides in intact and detergent-solubilized membranes. *J. Cell. Biol.*, Vol. 108, 299-307.

- Dahmann, C. et al. (1995). S-phase-promoting cyclin-dependent kinases prevent re-replication by inhibiting the transition of replication origins to a pre-replicative state. *Curr. Biol.*, Vol. 5, 1257-1169.
- Deshaies, R. J. and Schekman, R. (1987). A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum.. *J. Cell Biol.*, Vol. 105(2), 633-645.
- Deshaies, R. J. and Schekman, R. (1989). SEC62 encodes a putative membrane protein required for protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.*, Vol. 109, 2653-2664.
- Deshaies, R. J. and Schekman, R. (1990). Structural and functional dissection of Sec62p, a membrane-bound component of the yeast Endoplasmic Reticulum protein import machinery. *Mol. Cell. Biol.*, Vol 10, 6024-35.
- Deshaies, R. J. et al. (1988). A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature*, Vol. 322, 800-805.
- Deshaies, R. J. et al. (1991). Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature*, Vol. 349, 806-808.
- Driessen, A.J. (1992). Precursor protein translocation by the Escherichia coli translocase is directed by the protonmotive force. *EMBO J.*, Vol. 11, 847-853.
- Dünnwald, M. et al. (1999). Detection of transient in vivo interactions between substrate and transporter during protein translocation into the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.*, Vol. 10, 329-344.
- Duong, F. and Wickner, W. (1997). The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling. *EMBO J.*, Vol. 16, 4871-79.
- Economou, A. and Wickner, W. (1994). SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell*, Vol. 78, 835-843.
- Economou, A. et al. (1995). SecA membrane cycling at Sec YEG is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by SecD and SecF. *Cell*, Vol. 83, 1171-1181.
- Eichler, J. and Wickner, W. (1997). Both an N-terminal 65-kDa domain and a C-terminal 30-kDa domain of SecA cycle into the membrane at SecYEG during translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 94, 5574-81.

- Eichler, J. et al. (1998). Endogenous SecA catalyzes preprotein translocation at SecYEG. *J. Biol. Chem.*, Vol. 273, 21675-81.
- Esnault, Y. et al. (1993). The yeast SSS1 gene is essential for secretory protein translocation and encodes a conserved protein of the endoplasmic reticulum. *EMBO J.*, Vol. 12, 4083-4093.
- Evans, E.A. et al. (1986). Purification of microsomal signal peptidase as a complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 83, 581-585.
- Fang, H. and Green, N. (1994). Nonlethal sec71-1 and sec72-1 mutations eliminate proteins associated with the Sec63p-BiP complex from *S. cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, Vol. 5, 933-942.
- Feldheim, D. and Schekman, R. (1994). Sec72p contributes to the selective recognition of signal peptides by the secretory polypeptide translocation complex. *J. Cell Biol.*, Vol. 126, 935-943.
- Feldheim, D. et al. (1992). Topology and functional domains of Sec63p, an Endoplasmic Reticulum membrane protein required for secretory protein translocation. *Mol. Cell. Biol.*, Vol. 12, 3288-96.
- Feldheim, D. et al. (1993). Structural and functional characterization of Sec66p, a new subunit of the polypeptide translocation apparatus in the yeast Endoplasmic Reticulum. *Mol. Biol. Cell*, Vol. 4, 931-939.
- Finke, K. et al. (1996). A second trimeric complex containing homologs of the Sec61p complex functions in protein transport across the ER membrane of *S. cerevisiae*. *EMBO J.*, Vol. 15, 1482-1494.
- Gietz, R.D. et al. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DANN/PEG procedure. *Yeast*, Vol. 11, 355-360.
- Gilmore, R. et al. (1982). Protein translocation across the endoplasmic reticulum. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor. *J. Cell Biol.*, Vol. 95, 470-77.
- Goebel, M. and Yanagida, M. (1991). The TPR snap helix: a novel protein repeat motif from mitosis to transcription. *TIBS*, Vol. 16, 173-177.
- Görlich, D. and Rapoport, T.A. (1993). Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the Endoplasmic Reticulum membrane. *Cell*, Vol. 75, 1-20.
- Görlich, D. et al. (1992). A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell*, Vol. 71, 489-503.

- Green, N. et al. (1992). Mutants in three novel complementation groups inhibit membrane protein insertion into and soluble protein translocation across the Endoplasmic Reticulum membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.*, Vol 116, 597-604.
- Haeuptle, M.T. et al. (1989). A tripartite structure of the signals that determine protein insertion into the Endoplasmic Reticulum membrane. *J. Cell Biol.*, Vol. 108, 1227-1236.
- Hamman B.D. et al. (1998). BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell*, Vol. 92, 747-758.
- Hamman, B.D. et al. (1997). The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane. *Cell*, Vol. 89, 535-544.
- Hanada, M. et al. (1994). Reconstitution of an efficient protein translocation machinery comprising SecA and the three membrane proteins SecY, SecE and SecG (p12). *J. Biol. Chem.*, Vol. 269, 23625-31.
- Hanein, D. et al. (1996). Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. *Cell*, Vol. 87, 721-732.
- Hartmann, E. et al. (1994). Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. *Nature*, Vol. 367, 654-657.
- Heijne, G. von (1985). Signal sequences. The limits of variations. *J. Mol. Biol.*, Vol 184, 99-105.
- Heijne, G. von (1990). The signal peptide. *J. Membrane Biol.*, Vol. 115, 195-201.
- Huffacker, T.C. et al. (1987). Genetic analysis of the yeast cytoskeleton. *Annu. Rev. Genet.*, Vol. 21, 259-294.
- Johnsson, N. and Varshavsky, A. (1994). Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 91, 10340-10344.
- Jungnickel, B. and Rapoport, T.A. (1995). A posttargeting signal sequence recognition event in the Endoplasmic Reticulum membrane. *Cell*, Vol. 82, 261-270.
- Kalies, K.U. et al. (1998). The  $\beta$ -subunit of the Sec61 complex facilitates cotranslational protein transport and interacts with the signal peptidase during translocation. *J. Cell Biol.*, Vol. 141, 887-894.
- Kim, Y.J. et al. (1994). SecA protein is exposed to the periplasmic surface of the E.coli inner membrane in its active state. *Cell*, Vol. 78, 845-53.



- Kranz, J.E. and Holm, C. (1990). Cloning by function: An alternative approach for identifying yeast homologs of genes from other organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 87, 6629-6633.
- Kurihara, T. and Silver, P. (1993). Suppression of a sec63 mutation identifies a novel component of the yeast Endoplasmic Reticulum translocation apparatus. *Mol. Biol. Cell.*, Vol. 4, 919-930.
- Laird, V. and High, S. (1997). Discrete cross-linking products identified during membrane protein biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, Vol 272, 1983-1989.
- Lipp, J. et al. (1989). Structural requirements for membrane assembly of proteins spanning the membrane several times. *J. Cell Biol.*, Vol. 109, 2013-2022.
- Lütcke, H. (1995). Signal recognition particle (SRP), a ubiquitous initiator of protein translocation. *FEBS*, Vol. 228, 531-550.
- Lyman, S. K. and Schekman, R. (1995). Interaction between BiP and Sec63p is required for the completion of the protein translocation into the ER of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.*, Vol 131, 1163-1171.
- Lyman, S.K. and Schekman, R. (1997). Binding of secretory precursor polypeptides to a translocon subcomplex is regulated by BiP. *Cell*, Vol. 88, 85-96.
- Matlack, K. E. S. et al. (1997). Protein transport by purified yeast Sec-complex and Kar2p without membranes. *Science*, Vol. 277, 938-941.
- Matlack, K. E. S. et al. (1999). BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro- $\alpha$  Factor across the ER membrane. *Cell*, Vol. 97, 553-564.
- Menzel, R. et al. (1996). Topogenesis of a microsomal cytochrome P450 and induction of Endoplasmic Reticulum membrane proliferation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 330, 97-109.
- Meyer, D. et al. (1982). Secretory protein translocation across membranes: the role of the 'docking protein'. *Nature*, Vol. 297, 647-650.
- Meyer, T. H. et al. (1999). The bacterial Sec Y/E translocation complex forms channel-like structures similar to those of the eukaryotic Sec61p complex. *J. Mol. Biol.*, Vol. 285, 1789-1800.
- Misselwitz, B. et al. (1998). J proteins catalytically activate Hsp70 molecules to trap a wide range of peptide sequences. *Mol. Cell.*, Vol. 2, 593-603.
- Möller, I. et al. (1998). Unregulated exposure of the ribosomal M-site caused by NAC depletion results in delivery of non-secretory polypeptides to the Sec61 complex. *FEBS*, Vol. 441, 1-5.

- Neuhof, A. et al. (1998). Binding of signal recognition particle gives ribosome/nascent chain complexes a competitive advantage in endoplasmic reticulum membrane interaction. *Mol. Biol. Cell*, Vol. 9, 103-115.
- Ng, D.T.W. and Walter, P. (1996). ER membrane protein complex required for nuclear fusion. *J. Cell Biol.*, Vol. 132, 499-509.
- Ng, D.T.W. et al. (1996). Signal sequences specify the targeting route to the Endoplasmic Reticulum membrane. *J. Cell Biol.*, Vol. 134, 269-278.
- Nishiyama, K. et al. (1996). Inversion of the membrane topology of SecG coupled with SecA-dependent preprotein translocation. *Cell*, Vol. 85, 71-81.
- Noel, P. and Cartwright, I.L. (1994). A Sec62p-related component of the secretory protein translocon from *Drosophila* displays developmentally complex behavior. *EMBO J.*, Vol. 13, 5253-61.
- Osborne, R.S. and Silhavy, T.J. (1993). *PrlA* suppressor mutations cluster in regions corresponding to three distinct topological domains. *EMBO J.*, Vol. 12, 3391-98.
- Palade, G. (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*, Vol. 189, 347-358.
- Panzner, S. et al. (1995). Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell*, Vol. 81, 561-570.
- Plath, K. et al. (1998). Signal sequence recognition on posttranslational protein transport across the yeast ER membrane. *Cell*, Vol. 94, 795-807.
- Pohlschröder, M. et al. (1997). Protein translocation in the three domains of life: Variations on a theme. *Cell*, Vol. 91, 563-566.
- Radanyi, C. et al. (1994). The ability of the immunophilin FKBP59-HBI to interact with the 90-kDa heat shock protein is encoded by its tetratricopeptide repeat domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 91, 11197-11201.
- Raden, D. and Gilmore, R. (1998). Signal recognition particle-dependent targeting of ribosomes to the rough Endoplasmic Reticulum in the absence and presence of the nascent polypeptide-associated complex. *Mol. Biol. Cell*, Vol. 8, 117-130.
- Ramamurthy, V. and Oliver, D. (1997). Topology of the integral membrane form of *E. coli* SecA protein reveals multiple periplasmically exposed regions and modulation by ATP binding. *J. Biol. Chem.*, Vol. 272, 23239-46.
- Rapiejko, P.J. and Gilmore, R. (1994). Signal sequence recognition and targeting of ribosomes to the Endoplasmic Reticulum by the signal recognition particle do not require GTP. *Mol. Biol. Cell*, Vol. 5(8), 887-897.

- 
- Rothe, C. and Lehle, L. (1998). Sorting of invertase signal peptide mutants in yeast dependent and independent on the signal-recognition particle. *FEBS*, Vol. 252, 16-24.
- Sadler, I. et al. (1989). A yeast gene important for protein assembly into the ER and the nucleus has homology to DnaJ, an E.coli heat shock protein. *J. Cell Biol.*, Vol. 109, 2665-75.
- Sambrook et al., 2nd edition, 1989. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schatz, P.J. et al. (1991). One of three transmembrane stretches is sufficient for the functioning of the SecE protein, a membrane component of the E.coli secretion machinery. *EMBO J.*, Vol. 10, 1749-57.
- Scidmore, M.A. et al. (1993). Genetic interactions between KAR2 and SEC63, encoding eukaryotic homologues of Dank and DnaJ in the Endoplasmic Reticulum. *Mol. Biol. Cell*, Vol. 4, 1145-1159.
- Skowronek, M.H. et al. (1999). Molecular characterization of a novel mammalian DnaJ-like Sec63p homolog. *Biol. Chem.*, Vol. 380, 1133-1138.
- Spiess, M. (1995). Heads or tails – what determines the orientation of proteins in the membrane. *FEBS Lett*, Vol. 369, 76-79.
- Tajima, S. et al. (1986). The signal recognition particle receptor is a complex that contains two distinct polypeptide chains. *J. Cell Biol.*, Vol. 103, 1167-1178.
- Voigt, S. et al. (1996). Signal sequence-dependent function of the TRAM protein during early phases of protein transport across the Endoplasmic reticulum membrane. *J. Cell Biol.*, Vol. 134, 25-35.
- Walter, P. and Blobel, G. (1980). Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the Endoplasmic Reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 77, 7112-7116.
- Walter, P. and Blobel, G. (1981). Translocation of proteins across the Endoplasmic Reticulum. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J. Cell Biol.*, Vol. 91, 557-561.
- Wang, S. et al. (1995). NAC covers ribosome-associated nascent chains thereby forming a protective environment for regions of nascent chains just emerging from the peptidyl transferase Center. *J. Cell Biol.*, Vol. 130, 519-528.
- Wickner, W.T. and Lodish, H.F. (1985). Multiple mechanisms of protein insertion into and across membranes. *Science*, Vol. 230, 400-407.

- 
- Wiedmann, B. et al. (1994). A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature*, Vol. 370, 434-440.
- Wilkinson, B.M. et al. (1996). Molecular architecture of the ER translocase probed by chemical crosslinking of Sss1p to complementary fragments of Sec61p. *EMBO J.*, Vol. 16, 4549-4559.
- Wilkinson, B.M. et al. (1996b). Determination of the transmembrane topology of yeast Sec61p, an essential component of the Endoplasmic Reticulum translocation complex. *J. Biol. Chem.*, Vol. 271, 25590-97.
- Wittke, S. et al. (1999). Probing the molecular environment of membrane proteins in vivo. *Mol. Biol. Cell*, Vol. 10, 2519-2530.
- Woolford, J.L. (1989). Nuclear pre-mRNA splicing in yeast. *Yeast*, Vol. 5, 439-457.
- Woollatt, E. et al. (1999). Human Sec63 endoplasmic reticulum membrane protein, map position 6q21. *Chromosome Res.*, 1999, 77.

---

## Danksagung

Den experimentellen Teil dieser Arbeit begann ich am Max-Delbrück-Centrum (MDC) für molekulare Medizin in Berlin-Buch in der Arbeitsgruppe von Prof. E. Hartmann. Während und nach Abschluß meiner Zivildienstzeit setzte ich die Arbeit im Labor von Prof. S. Prehn im Institut für Biochemie der Charite-Berlin fort. Die Experimente zur chemisch-photoreaktiven Quervernetzung machte ich während eines Forschungsaufenthalts im Labor von Prof. T.A. Rapoport an der Harvard Medical School in Boston.

Ich möchte mich vor allem bei meinen Betreuern Enno Hartmann und Siegfried Prehn bedanken. Zum einen dafür, daß die inhaltliche Betreuung auch unter der Distanz Berlin-Göttingen nicht gelitten hat, zum anderen, daß es möglich war, meine Arbeit an der Charite zu Ende zu führen. Des weiteren möchte ich Prof. T.A. Rapoport für die intensive Zeit während meines Aufenthalts in Boston danken und für das ständige Interesse an meiner Arbeit.

Diese Arbeit wäre niemals ohne die vielen Diskussionen, Ratschläge und Unterstützungen von einer Vielzahl von Labormitgliedern zustande gekommen. Deswegen möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Hartmann, Prehn, Sommer und Rapoport bedanken. Besonders bei Brigitte Nentwig, Angelika Wittstruck, Elke Bürger und Ingrid Krenz für die vielen kleinen täglichen Hilfen. Nicht denkbar wäre der Erfolg meiner Arbeit gewesen ohne die vielen Diskussion mit Kerstin Finke und Hellmuth Meyer zu Beginn meiner Arbeit und mit Jacqueline Franke, und vor allem Brigitte Wiedmann während meiner Zeit an der Charite. Brigitte Wiedmann, Jacqueline Franke und Enno Hartmann danke ich für das Lesen der Promotionsschrift und die Korrekturvorschläge.

Laborarbeit hat ein einnehmendes Wesen, und so möchte ich mich ganz besonders bei meiner Freundin Katja dafür bedanken, daß sie mich in dieser Zeit begleitet und für so vieles Verständnis gezeigt hat. Mein Dank gilt nicht zuletzt auch meinen Eltern und meiner Familie, die nicht müde wurden mich dort zu unterstützen, wo sie es konnten.

---

## Lebenslauf

1976 - 1982	Besuch der St. Alfons Grundschule in Berlin-Lankwitz
1982 - 1989	Besuch des Gymnasiums der Kath. Schule St. Marien in Berlin
WS 1989	<b>Studium der Chemie</b> an der FU Berlin
SS1990 - WS 1994/5	<b>Studium der Biochemie</b> im Fachbereich Chemie an der FU Berlin.
Dez. 1993 – Nov. 1994	<b>Diplomprüfung</b> in den Fächern Organische Chemie, Biochemie und Immunologie  Anfertigung einer <b>Diplomarbeit</b> zum Thema 'Überexpression von Komponenten des Sec61-Komplexes im Baculovirus-System' in der AG Rapoport am MDC-Berlin
seit Jan. 1995	<b>Promotion</b> in der AG Hartmann am MDC-Berlin zum Thema 'Aufklärung des posttranslationalen Targeting-mechanismus in <i>S.cerevisiae</i> '
Juni 1997 – Juni 1998	Unterbrechung der Promotion zur Absolvierung meines <b>Zivildienstes</b>
seit Juli 1998	<b>Fortführung der Promotion</b> in der AG Prehn, Inst. für Biochemie der Charité-Berlin
sonstige Aktivitäten	Mitglied des Arbeitskreises Öffentlichkeitsarbeit der Gesellschaft für Molekularbiologie und Biochemie.  Freier Mitarbeiter in der Öffentlichkeitseinrichtung „Gläsernes Labor“ in Berlin-Buch.

## **Eidestattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, Christian Unger, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe. Darüber hinaus habe ich mich weder anderwärts um einen Doktorgrad beworben noch bin ich in Besitz eines entsprechenden Doktorgrades.

Berlin, den 9. Januar 2000

*Christian Unger*